

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y
NEUROCIENCIA**

**“ONTOGENIA DE LA HETEROGENEIDAD
ASTROGLIAL Y SU PAPEL EN LA MIGRACIÓN
POSTNATAL AL BULBO OLFATIVO”**

JORGE GARCÍA MARQUÉS

Directora de tesis: Dra. Laura López Mascaraque
Laboratorio de Desarrollo Telencefálico
Dpto. Neurobiología Molecular, Celular y de Desarrollo
Instituto Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas





LAURA LÓPEZ MASCARAQUE, Científica Titular del Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA que el presente trabajo titulado “ONTOGENIA DE LA HETEROGENEIDAD ASTROGLIAL Y SU PAPEL EN LA MIGRACIÓN POSTNATAL AL BULBO OLFATIVO”, ha sido realizado bajo mi dirección por D. Jorge García Marqués en Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo del Instituto Cajal. Dicho trabajo reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que así conste, lo firmo en Madrid a 14 de Febrero del 2012

Fdo. Laura López Mascaraque

Llegado a este punto solo me queda agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible, directa o indirectamente, la realización de este trabajo, las mismas personas que de uno u otro modo me apartaron de la locura o de la tristeza.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, Laura, por haberme acogido en su laboratorio y haberme dado la oportunidad de hacer realidad mi sueño. Desde que entré tengo la sensación de ser un privilegiado, y a parte de por el nivel científico al que nos acostumbrabas, esto se debe a lo que cuidas a tu gente. Laura, muchas gracias por hacer mucho más de lo necesario o de lo esperado, por anteponer que estemos a gusto a cualquier otra cosa, por estar ahí sin cortarme las alas. Casi siempre fue difícil estar a tu altura.

A Juan, por su respeto, por sus lecciones de historia y sobre todo, por introducirme en el mundo de las ostras.

A Fer, que no creo que sepa todo lo que me ha enseñado y ayudado. Estuviste ahí cuando más falta me hizo, con tus ánimos y tus palabras Gandalfianas cargadas de la sabiduría que te da la barba. A Blanchi, por las risas y por ponerme a perfundir embriones el primer día que llegué. Desde que os fuisteis no me puedo quitar la sensación de que mi destino era abandonar la isla con vosotros. Al señor Eduardo, porque estuvo ahí cuando necesité que estuviera y porque hay cosas que solo me entiende él. Espero que esto sirva de prueba ante un tribunal.

Dentro de la nueva hornada, mi más profundo agradecimiento a María, por las risas, por aguantarme, por su apoyo tan al borde del barranco. A Sandrita, por sus abrazos en mis días de ogro en los que no hablo a nadie. A Hairen, mi primer pollito que supo cuidarme tanto. Al resto de satélites y a las futuras promesas, Andrés, Yoli, Marieta, Marian, Raúl... Conmigo os llevo.

También quiero agradecer a todos mis amigos Cajalienses, que me invitaron a cafés antes que les dijera que lo necesitaba. Martita, mucha suerte. Mechita, gracias por tu apoyo y por saber transmitirlo. Al resto que no llevaban cambio pero que no dudo que lo hicieran. Antoñito y Gonzalo (os pongo como pareja de hecho), por tanta charla científica y sobre todo física. Suerte mañana!. A Irene, por los viernes para tres. A todos los demás Cajaliense que me habéis ayudado de una u otra forma.

Una vez lo necesité y Charly estuvo ahí. Muchas gracias a ti y a tu laboratorio que me hizo estar como en casa a más de 6000 km. A otros tantos científicos que me ayudaron. Carlos Crespo, gracias por las fotos de microscopía electrónica y sobre todo por las noches en las playas asturianas. A Iván, por acogerme en tu laboratorio y enseñarme tanto sobre transgénicos. A Paco y Citlali, por vuestro cariño conmigo os llevo. Al tribunal, que tendrá que perder tiempo de estar con sus familiares y amigos para leer esta tesis.

Dieguito, hasta el último momento me has dado ánimos y siempre has estado ahí. Sé que no te gustan los agradecimientos ni en general llamar la atención pero quiero que sepas que eres imprescindible en mi vida. Muchas gracias!!!. Al resto de biólogos y no biólogos, Prefe, Ali, Anita, etc., porque siempre tengo la sensación de que estáis ahí. A Chusi y Miguel, sois encantadores!!! Os deseo la mejor suerte del mundo en vuestra nueva etapa que no me pienso perder. A Javi,

Aroa, Susana, Jesús, etc. o mejor dicho, a meto, respeta, seta, respeto, etc. A Pablo y Mika, espero que os vaya genial vuestra vida en tierras nórdicas. A mi familia, tíos, tías, primos y demás, por vuestro cariño. Al Gran Tizón, por desconectarme de lo humano cuando lo necesité y escribir cosas como “Rrry67uumnj877hyi`„lp Çb” Intenté integrarlo en la tesis, pero no entendí muy bien a qué te referías.

A mis padres, Luciano y Felisa. Habéis hecho muchísimo más de lo que se espera de unos padres. Me habéis apoyado siempre, sabiendo respetar mis opiniones. Papa, muchas gracias por enseñarme biología antes que nadie, en las mañanas de pesca o en los paseos por el campo. Anda, que si llegas a saber que te iba a salir un hijo biólogo. Mama, eres una fuente de cariño infinita. Siempre estás ahí cuando se te necesita, siempre. A Raúl, por su cariño y nobleza. Jamás podría imaginarme un hermano mejor. No sabéis hasta dónde llega mi amor y admiración por vosotros.

A Marisilla. Cuento los (13) años como antes o después de ti. Has crecido conmigo y hemos aprendido casi todo juntos. Hemos pasado tantas cosas... ¿Te acuerdas de cuando quedábamos con tu perrita en el parque? Éramos unos niños que teníamos las cosas muy claras. ¿Quién nos iba a decir entonces que íbamos a tener una casita y una familia (peluda)? Muchas gracias por tu apoyo absolutamente incondicional desde entonces y por tu amor sin fin. ¿Sabes? Ni los barcos ni los aviones salen si no subimos juntos. Y las aduanas cierran cuando no nos ven de la mano.

De alguna forma todos habéis sido imprescindibles para la realización de esta tesis. Además, casi todos tenéis en común que seguís llamando aunque no os coja el teléfono, incluso aunque a algunos solo os veo los 29 de Febrero. Muchas gracias a todos.

A Marisilla,

A mis padres y hermano.

Entiendo que estoy esta noche aquí porque la planta del maíz, con la que he trabajado durante muchos años, reveló un fenómeno genético que estaba totalmente en desacuerdo con el dogma de la época, los años cuarenta. Recientemente, con la aceptación general del fenómeno, me han preguntado, en particular los jóvenes investigadores, cómo me sentí durante el largo periodo cuando mi trabajo fue ignorado, desechado o cercano a la frustración. Al principio, debo admitir, me sorprendió y después me desconcertó, ya que pensé que la evidencia y la lógica que sostenían mi interpretación fueron suficientemente reveladoras. Pronto tuve claro, sin embargo, que los supuestos tácitos - la base del dogma, sirvieron como una barrera a la comunicación efectiva. Mi comprensión del fenómeno responsable de cambios rápidos en la acción génica, incluyendo expresión variegada comúnmente vista en plantas y animales, fue demasiado radical para la época. Una persona necesitaría tener mis experiencias u otras similares para penetrar esa barrera. Posteriormente, varios genetistas trabajando en maíz, reconocieron y exploraron la naturaleza de este fenómeno, y probablemente sintieron las mismas exclusiones. Nuevas técnicas hicieron posible darse cuenta de que el fenómeno fue universal, pero esto fue muchos años después. En el tiempo entre medias, no fui invitada a dar charlas o seminarios, excepto en raras ocasiones, o para servir en distintos comités y mesas de trabajo, o para llevar a cabo otras tareas asociadas a los científicos. En lugar de que me causase dificultades personales, este largo periodo resultó ser una delicia. Me permitió libertad para continuar las investigaciones sin interrupción, y por la pura alegría que proporcionaban.

Discurso de Barbara McClintock's en el banquete de la entrega del premio nobel. 1983

I understand I am here this evening because the maize plant, with which I have worked for many years, revealed a genetic phenomenon that was totally at odds with the dogma of the times, the mid-nineteen forties. Recently, with the general acceptance of this phenomenon, I have been asked, notably by young investigators, just how I felt during the long period when my work was ignored, dismissed, or aroused frustration. At first, I must admit, I was surprised and then puzzled, as I thought the evidence and the logic sustaining my interpretation of it, were sufficiently revealing. It soon became clear, however, that tacit assumptions - the substance of dogma - served as a barrier to effective communication. My understanding of the phenomenon responsible for rapid changes in gene action, including variegated expressions commonly seen in both plants and animals, was much too radical for the time. A person would need to have my experiences, or ones similar to them, to penetrate this barrier. Subsequently, several maize geneticists did recognize and explore the nature of this phenomenon, and they must have felt the same exclusions. New techniques made it possible to realize that the phenomenon was universal, but this was many years later. In the interim I was not invited to give lectures or seminars, except on rare occasions, or to serve on committees or panels, or to perform other scientists' duties. Instead of causing personal difficulties, this long interval proved to be a delight. It allowed complete freedom to continue investigations without interruption, and for the pure joy they provided.

Barbara McClintock's speech at the Nobel Banquet, December 10, 1983

AA	Regiones adyacentes a la RMS
ATP	Adenosin Trifosfato
BLBP	Proteína de unión a lípidos del cerebro
BO	Bulbo olfativo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cx	Corteza cerebral
Dcx	Doblecortina
DIV	Días <i>in vitro</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GFP	Proteína fluorescente verde
GL	Capa glomerular del bulbo olfativo
GS	Enzima Glutamina sintetasa
H2B	Histona H2B
hGFAP	Promotor del GFAP humano
mKO	Proteína fluorescente monomérica naranja Kusabira
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NG2	Antígeno neurona glía 2
OLP/OPC	Célula precursora de oligodendrocitos
ONL	Capa nerviosa del bulbo olfativo
PB	Tampón fosfato
PFA	Paraformaldehído
RFP	Proteína fluorescente roja
RMS	Ruta de migración rostral
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción de la polimerasa y de la retrotranscriptasa
S100 β	Proteína β de unión a calcio S100
SEZ	Zona subependimaria
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SVZ	Zona subventricular
UA	Unidades aleatorias
XFP	Proteína fluorescente
YFP	Proteína fluorescente amarilla

ÍNDICE

I. GLIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL—	3
A. INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO DE GLÍA—	3
B. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA GLÍA—	3
Primeras descripciones de astroglia y sus funciones —	4
Historia del tercer elemento y otros tipos gliales —	8
C. EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES GLIALES—	9
¿Cuándo y cuántas veces aparece la glía en la evolución? —	10
¿Cómo aparecieron las primeras poblaciones gliales en la evolución? —	13
¿Por qué surge la glía durante la evolución? —	14
D. TIPOS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL—	15
Macroglia —	15
<i>Astroglia —</i>	15
Glía Radial —	16
Ependimoglia—	17
Células de Müller —	18
Glía de Bergmann —	18
Astrocitos protoplásmicos —	19
Astrocitos fibrosos —	19
Astrocitos velados —	19
Astrocitos radiales —	20
Astrocitos interlaminares —	20
Glia Marginal —	20
<i>Oligodendroglia —</i>	20
Oligodendrocitos tipo I y II: —	21
Oligodendrocitos tipo III —	21
Oligodendrocitos tipo IV —	21
<i>Polidendrocitos o células NG2 —</i>	22
<i>Células de glia envolvente—</i>	23
Microglia —	23

E. IDENTIDAD Y FUNCIONES ASTROCITARIAS — 25

Identidad—	25
Funciones en el cerebro —	28
<i>Soporte estructural —</i>	29
<i>Control del pH, osmolaridad y concentración de iones extracelulares —</i>	29
<i>Soporte metabólico y eliminación de residuos —</i>	30
<i>Recaptura de neurotransmisores —</i>	30
<i>Funciones relacionadas con el desarrollo —</i>	30
<i>Funciones inmunes —</i>	31
<i>Funciones vasculares —</i>	31
<i>Procesamiento de la señal sináptica —</i>	32
<i>Respuesta a lesiones —</i>	33
DESARROLLO ASTROCITARIO Y GLIOGÉNESIS—	34

F. HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA — 38

Heterogeneidad regional —	39
Heterogeneidad local —	40

II. PAPEL DE LA ASTROGLÍA EN LA NEUROGÉNESIS DE INTERNEURONAS DE BULBO OLFATIVO — 41

A. NEUROGÉNESIS DE INTERNEURONAS DE BO COMO MODELO DE DESARROLLO — 41

B. FACTORES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS EN LA RMS: PAPEL DE LA MATRIZ ASTROGLIAL— 43

III. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL LINAJE CELULAR— 44

A. INTRODUCCIÓN A LOS LINAJES CELULARES— 44

B. MÉTODOS DE ANÁLISIS CLONAL DE LINAJES CELULARES— 45

Métodos prospectivos—	46
Métodos retrospectivos—	48

IV. MODELO ANIMAL Y SU MANIPULACIÓN — 57

A. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO —	57
B. DESARROLLO DEL RATÓN —	57
C. PROCEDENCIA Y CONDICIONES DE CRÍA —	57
D. ANESTESIA Y ANALGESIA —	58

V. CULTIVOS CELULARES Y ORGANOTÍPICOS — 58

A. CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN Y LIMPIEZA—	58
B. MEDIOS DE CULTIVO —	59
C. CULTIVOS DE ASTROCITOS EN MONOCAPAS —	60
D. CO-CULTIVO DE CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS —	62
E. CO-CULTIVO DE CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS DE DISTINTO ORIGEN EN EL MISMO POCILLO—	63
F. CO-CULTIVO DE TIPO NO CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS—	63
G. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RODAJAS DE CEREBRO—	65

VI. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO— 66

A. EXTRACCIÓN DE EMBRIONES DE RATONAS GESTANTES —	66
B. FIJACIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS —	66
C. CORTE DEL TEJIDO CEREBRAL—	67

VII. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA— 68

A. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS—	68
B. TÉCNICAS DE RT-PCR EN TIEMPO REAL A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO —	70
Muestras procedentes de cultivos de astrocitos —	71
Muestras procedentes de tejido—	71

VIII. GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS — 72

A. CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN—	72
B. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA—	72
C. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA—	73
D. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA—	73
E. DESFOSFATACIÓN DE PLÁSMIDOS CORTADOS PREVIAMENTE—	74

F. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON PLÁSMIDOS —	74
G. PREPARACIÓN DE STOCKS DE GLICEROL —	74
H. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR —	74
I. INSERCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR EN VECTORES MEDIANTE CLONAJE TA —	75
J. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO —	76
K. CONFIRMACIÓN DE LA FIDELIDAD DE LOS CLONAJES —	76
L. ESTRATEGIAS DE CLONAJE —	77

IX. CIRUGÍA Y ELECTROPORACIONES DE PLÁSMIDOS INTRAÚTERO — 81

X. ANÁLISIS DE DATOS — 83

A. MICROSCOPIA —	83
Microscopía de contraste de fases y epifluorescencia —	83
Microscopía confocal —	84
B. ANÁLISIS <i>TIME-LAPSE</i> DE MUESTRAS DE CULTIVOS—	85
Co-cultivos de explantes de RMS y monocapas de astrocitos—	85
Cultivos organotípicos de rodajas de cerebro—	86
C. ANÁLISIS DE IMAGEN —	86
D. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO—	86
Cuantificaciones de clones piales —	86
Análisis estadístico —	87

XI. INFLUENCIA ASTROGLIAL EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS PROGENITORES DE INTERNEURONAS DE BO — 91

A. DEFINICIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES OBJETO DE ESTUDIO—	91
Regiones permisivas para la migración—	91
Regiones no permisivas para la migración—	92
B. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES ASTROGLIALES RELACIONADAS CON LA MIGRACIÓN DE PRECURSORES DE INTERNEURONAS DE BO—	92
C. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS POBLACIONES ASTROGLIALES EN LOS CULTIVOS EN MONOCAPA —	96
D. INFLUENCIA DEL ORIGEN ASTROGLIAL EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS DE LA RMS —	97
E. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DINÁMICA CELULAR ENTRE LAS DISTINTAS MONOCAPAS—	100
F. NATURALEZA DE LOS FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LAS DIFERENCIAS MIGRATORIAS—	103
Co-cultivos dobles de tipo contacto —	103
Co-cultivos de tipo no-contacto —	105
G. EXPRESIÓN DE GENES DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR —	106

XII. CONTRIBUCIÓN DEL DESARROLLO A LA GENERACIÓN DE HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA—108

A. <i>STAR TRACK</i>: UNA NUEVA HERRAMIENTA DE ANÁLISIS CLONAL DE ASTROCITOS <i>IN VIVO</i> —	109
B. PRUEBAS PRELIMINARES DE <i>STAR TRACK</i> PARA EL MARCAJE DE LINAJES ASTROCITARIOS—	111

C. RELACIÓN ENTRE LA REGIÓN ELECTROPORADA Y LA MIGRACIÓN DE PROGENITORES ASTROGLIALES —	113
------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

D. ANALISIS DE LA DISPERSIÓN INICIAL DE PROGENITORES ASTROGLIALES —	114
----------------------------------------------------------------------------	------------

E. DINÁMICA DE DISPERSIÓN CLONAL ASTROCITARIA TEMPRANA EN CORTEZA —	116
----------------------------------------------------------------------------	------------

F. PATRÓN DE DISPERSIÓN FINAL DEL LINAJES ASTROCITARIOS—	118
-----------------------------------------------------------------	------------

Cuerpo calloso y corteza cerebral—	118
-------------------------------------------	------------

Análisis de las poblaciones astrogliales piales en relación con su origen—	122
-----------------------------------------------------------------------------------	------------

Corriente migratoria rostral—	122
--------------------------------------	------------

Bulbo olfativo—	126
------------------------	------------

XIII. HETEROGENEIDAD ASTROGLIAL EN EL SOPORTE DE LA MIGRACIÓN IN VITRO DE PROGENITORES DE INTERNEURONAS DEL BULBO OLFATIVO—	135
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

XIV. MODELO DE MIGRACIÓN BASADO EN LAS IMPLICACIONES DE LA HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA INTRÍNSECA —	157
------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

XV. HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA Y EVOLUCIÓN —	162
------------------------------------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

I. GLIA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

A. INTRODUCCIÓN AL CONCEPTO DE GLÍA

A lo largo de millones de años de evolución, los organismos han tenido que dar respuestas efectivas a estímulos concretos. La efectividad de dichas respuestas ha condicionado absolutamente la supervivencia de todos los seres vivos. El sistema nervioso surge durante la evolución como una de las mejores soluciones a este problema. Si bien no ha sido la única, sí constituye una de las más complejas y precisas que en última instancia genera la conciencia como máxima expresión de dicha complejidad. Tal principio se manifiesta en la evolución del sistema nervioso con la aparición de dos tipos celulares que aunque han recibido distintos nombres todos ellos podrían resumirse en dos conceptos. Por una parte el concepto de célula excitable que participa directa y de modo increíblemente rápido en la transmisión y procesamiento del estímulo. Por otra parte el concepto de glía, como aquella célula que hace el resto de lo necesario para que eso sea así, desde crear a la célula excitable hasta mantenerla, o actuar indirectamente en la vía estímulo-respuesta.

B. ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA GLÍA

La historia del descubrimiento de la glía fue, en sus orígenes, paralela a la aparición de la Teoría Celular. Curiosamente, es probable que la primera referencia a la neuroglía fuese en invertebrados, ya que Dutrochet (1824) describió unos pequeños glóbulos (*corpuscules globuleux*; que corresponderían a las células de glía), presentes en grandes cantidades en la superficie de otros glóbulos de mayor tamaño (*cellules globuleuses*; células nerviosas) en el sistema nervioso de dos tipos de moluscos. A pesar que Robert Remak describió una envuelta alrededor de fibras nerviosas (1838) y Müller

ilustró, prácticamente a la vez, la presencia de fibras radiales de glía en la retina (Müller, 1851), ha sido generalmente aceptado que fue Rudolph Virchow quien, en 1846 (Virchow, 1846), describió en el SNC la existencia de otro elemento distinto a las neuronas (**Figura 1**). Como patólogo, Virchow observó cambios inflamatorios en el cerebro y pensó que algún tipo de tejido conectivo era necesario para tales cambios. Virchow distinguió “una sustancia conectiva presente en el cerebro y médula espinal en la cual el resto de elementos del sistema nervioso se veían embebidos”. En 1856 (Virchow, 1856) acuñó el término de *nervenkitt* o *neuroglia* en referencia a esta sustancia que fue traducido como *nerve-glue* o *nerve-cement* (en castellano, pegamento o cemento

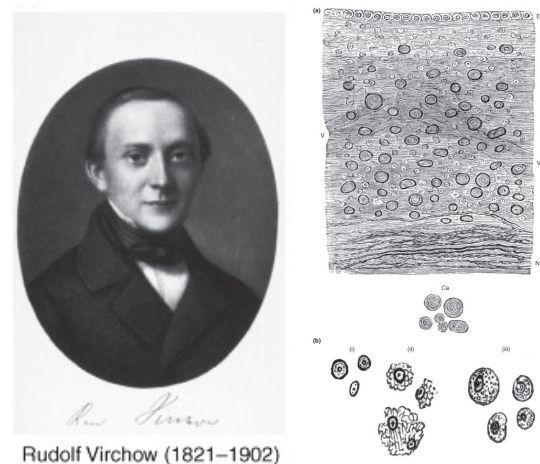


Figura 1. Retrato de Rudolph Virchow y sus dibujos que constituyen una de las primeras descripciones sobre las células gliales.

nervioso). No obstante, Virchow utilizó este término para denominar al material intersticial o tejido conectivo que rellenaba los espacios alrededor de las neuronas y no a las células gliales. De hecho, las primeras imágenes de una célula glial se atribuyen a Heinrich Müller (1868), quien describió la presencia de fibras radiales en la retina de distintas especies animales. Poco después que Virchow, Kölliker (1863) afirma que la trama fibrillar de la sustancia gris y blanca de los centros nerviosos, es en realidad una red compuesta por entrecruzamientos de las expansiones fibrilares de las células de neuroglía, lo cual fue confirmado por Golgi (1885). Asimismo, Deiters (1865) añade otra peculiaridad de estas células: al contrario que las neuronas, la glía no posee axones (Deiters, 1865), describiéndolas como un conjunto de células en forma de araña (*spinnzelle*). De hecho, posteriormente estas células se llamaron células de Deiters, quién además también se refirió a ellas como *schwammiporose* o con forma de esponja porosa, que como se verá posteriormente (ver Identidad astrocitaria), parece más acercado a la realidad (Young, 1991). A pesar de que la descripción de Virchow sigue siendo cierta, el concepto de la neuroglía y sus funciones ha cambiado fundamentalmente.

Una de las implicaciones del concepto de la glía como tejido conectivo fue que las células neurogliales derivaban del mesodermo, lo cual fue rechazado por Wilhelm His (His, 1889a, 1889b) quien posteriormente describió que las células gliales tenían un origen en el SNC y no en el mesénquima como se había asumido hasta entonces. Además, His concluyó que glía y neuronas se originaban a partir de grupos de progenitores distintos (His, 1889b). De hecho propuso que las neuronas derivaban de unos progenitores especializados llamados neuroblastos mientras que los astrocitos lo hacían de espongiblastos (que corresponderían a lo que hoy en día llamamos glía radial). Estos orígenes separados de neuronas y glía fueron ampliamente aceptados por otros autores aunque Schaper (Schaper, 1897) sugirió que las células germinales podían dar lugar a ambas neuronas y glía. Asimismo también reconoció tres tipos de espongiblastos dependiendo de que sus procesos contactasen con la superficie pial (de soporte), un vaso sanguíneo (polar) o con ninguna de las dos anteriores (migratorio; Penfield, 1932).

i. Primeras descripciones de astroglia y sus funciones

Las primeras ilustraciones de lo que hoy conocemos como astrocitos fueron aportadas por Deiters en el año 1865 (Cajal, 1909-1911), lo cual hizo que en un primer momento se les llamase células de Deiters. Más tarde, en 1893, Lenhossek introdujo el término “astrocito” para referirse a células neurogliales con forma de estrella (Lenhossék, 1893). Respecto a su origen en el desarrollo, Lenhossek (1893) mostró que los espongiblastos, de los cuales se sabía que tenían origen ectodérmico (His, 1889a, 1889b), se transformaban en astrocitos, lo cual demostraba que los astrocitos eran también de origen ectodérmico. Esto también fue postulado por Cajal, quien también favoreció la noción de que los astrocitos derivaban de células de glía radial y apoyó este argumento demostrando que existían formas transicionales a medio camino entre glía radial embrionaria y astrocitos adultos (Cajal, 1913).

En 1893, Andriezen distinguió por primera vez las diferencias entre astrocitos fibrosos, presentes en la sustancia blanca y astrocitos protoplásmicos, propios de la sustancia gris (Andriezen, 1893), a pesar que este hecho fue incorrectamente atribuido a Cajal (**Figura 2**). Aun así fue Cajal quien, utilizando primero la tinción de Weigert (1895) y posteriormente su nueva tinción con sublimado de oro (Cajal, 1913), adoptó dicha clasificación y llamó a ambos tipos celulares “astrocitos”. La tinción de Weigert fue especialmente útil ya que permitió a Cajal evidenciar la diferencia entre astrocitos fibrosos y protoplásmicos basándose en que las gliofibrillas no estaban presentes en los astrocitos protoplásmicos. Después, el método del oro sublimado le permitió reconocer que dichas fibrillas estaban presentes en ambos tipos de astrocitos. Todas estas técnicas de impregnaciones metálicas llevaron a Río Hortega (1921, 1922, 1933) y a Cajal (1920), a describir una gran variedad de formas y tamaños celulares, incluyendo un tipo de “astrocito intermedio”, previamente descubierto en el cerebelo por Terrazas (1897).

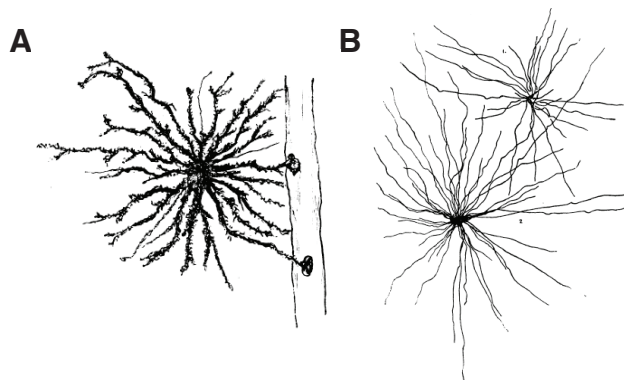


Figura 2. Imágenes de los astrocitos descritos por Andriezen en cerebro humano. A. Protoplásmicos. B. Fibrosos.

En relación con su posible función, Golgi (1885) describió el contacto frecuente entre procesos gliales, vasos sanguíneos y células nerviosas, atribuyéndoles a los astrocitos la función de suplementar nutrientes al cuerpo celular y axón de las células nerviosas. En 1907, Lugaro propuso que los astrocitos adultos mantenían el microambiente intersticial compatible con la función neuronal, postulando que estas células podían servir para procesar sustancias químicas liberadas por células nerviosas a fin de asegurar la comunicación entre estas células, así como controlar dicha comunicación en tiempo y espacio (Lugaro, 1907). Así pues, Cajal (1909-1911) rechazó la teoría “nutritiva” de Golgi y admitiendo su propia ignorancia por la falta de herramientas para el estudio de estas células, hipotetizó que las células gliales y sus procesos servían para aislar fibras nerviosas y ocasionalmente proliferaban para rellenar los huecos que dejaban las neuronas que morían en condiciones patológicas. No obstante, Cajal también anticipó muchas de las funciones y propiedades que se asignan hoy en día a los astrocitos (revisado en García-Marín y cols., 2007). Por ejemplo, sugirió que los astrocitos podían controlar la constricción/dilatación de los vasos sanguíneos, lo cual fue demostrado posteriormente, aunque en realidad no lo hacen a través del mismo mecanismo que él propuso. También sugirió que los astrocitos estaban modulando o interfiriendo la función neuronal. Asimismo, fue él quien describió uno de los fenómenos con más repercusión para este trabajo: la presencia de “grupos isogénicos” de astrocitos (Cajal, 1913) (**Figura 3**). Por un lado describió pares de astrocitos en el giro dentado del hipocampo adulto de humano y los llamó astrocitos gemelos. Lo interpretó como astrocitos que se habían dividido recientemente, especulando que los astrocitos podrían retener su habilidad para dividirse, a diferencia de las neuronas. Por otra parte también describió grupos de tres (triadas)

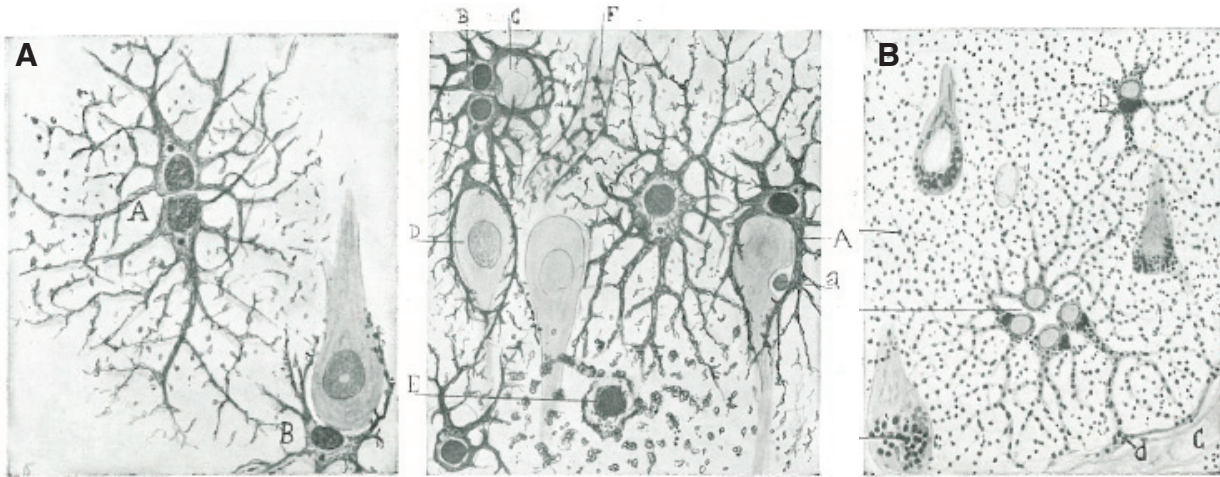


Figura 3. Grupos isogénicos de astrocitos descritos por Cajal. A. Astrocitos gemelos. **B.** Tétrada de astrocitos.

o cuatro (tétradas) astrocitos cercanos, atribuyéndoles una mitosis reciente. Por tanto, podríamos considerar a los grupos isogénicos como la primera descripción de clones de astrocitos.

Varios autores demostraron, asimismo, una de las propiedades más características de los astrocitos: su reactividad a la lesión (del Río-Hortega y Penfield, 1927; Sjöstrand, 1965; Adrian, 1968, Cavanagh, 1970) o a la degeneración Walleriana (Nissl, 1892, 1894; de Vries, 1910; Brodal, 1939). La mayoría de ellos concluyeron que los astrocitos no pueden experimentar división en reacción a estos elementos, pero Cammermeyer (1955), Sjöstrand (1965) y Cavanagh (1970) no pensaban así. De hecho Sjöstrand (1965), mediante el marcaje con timidina tritiada, encontró proliferación celular en el núcleo hipoglosa tras aplastamiento del nervio hipoglosa. Aunque según él, esta proliferación fue principalmente de macrófagos, también identificó algunos astrocitos dividiéndose.

Por otra parte, la historia de la glía radial comienza en el cerebelo, con las primeras descripciones de Bergmann (1857), quien mostró procesos verticales atravesando la capa molecular en desarrollo, si bien no reconoció que estas fibras estuvieran conectadas a cuerpos celulares. Aunque el concepto de glía radial ha sido atribuido (Cameron y Rakic, 1991; Rakic, 1995) a Magini por sus trabajos histológicos en mamíferos (Magini, 1888), otros investigadores casi coetáneos como Kolliker (1896), His (1887, 1888, 1889a, 1889b, 1904) Cajal (1909-1911), von Lenhossek (1893), Retzius (1893), Betcherew (1899) y Golgi (1885) también describieron las fibras radiales extendiéndose desde los ventrículos hasta la superficie pial. De hecho, Cajal fue el primero en sugerir que las fibras de glía radial eran en realidad procesos astrocitarios modificados que funcionaban como soporte durante la histogénesis cortical (Cajal, 1909-1911; Bentivoglio y Mazzarello, 1999). Así pues, mientras His especuló que estas fibras formarían un sincitio a través del cual migrarían los neuroblastos, Magini describió perfectamente la ocurrencia de células nerviosas en desarrollo a lo largo de los filamentos radiales, algo con lo que Cajal no estaba de acuerdo (Bentivoglio y Mazzarello, 1999). Magini llamó a estas células nerviosas varicosidades, y logró identificar en ellas la presencia de núcleos, lo cual le hizo llegar más lejos al postular que muy probablemente

representaban las futuras células nerviosas de la corteza cerebral e hipotetizando con que se originaban a través de multiplicaciones subsecuentes de las células endodurales epiteliales (Bentivoglio y Mazzeo, 1999). Estas primeras descripciones serían confirmadas muchos años después y mediante microscopía electrónica, por el italiano Godina (Godina, 1951).

Con la llegada de la segunda mitad del siglo XX, la aparición de la microscopía electrónica permitió analizar la ultraestructura de los astrocitos (Luse, 1956; Farquhar and Hartmann, 1957; Bunge y cols., 1960; De Robertis and Gershenfeld, 1961; Palay y cols., 1962). Basándose en las descripciones sobre el núcleo astrocitario que Penfield (1932) consiguió mediante marcajes de hematoxilina-eosina, varios de estos estudios identificaron a los astrocitos y describieron sus características ultraestructurales (Luse, 1956; Farquhar y Hartmann, 1957). Entre estas características, Herndon (1964) y Mugnaini y Walberg (1964) observaron que también los astrocitos protoplásmicos contenían gliofilamentos, lo cual confirmaba lo que Cajal había visto muchos años antes. De hecho, Mori y Leblond (1969) adaptaron el método del oro sublimado a la microscopía electrónica y encontraron que los depósitos metálicos estaban concentrados en los gliofilamentos.

La naturaleza bioquímica de los gliofilamentos fue revelada por Eng y cols., (1971) y Bignami y cols., (1972), a través de la identificación de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). De hecho, esta proteína se asoció a los filamentos intermedios de 8 a 10 nm (Eng y Kosek, 1974; Schachner y cols., 1977; Eng y Bigbee, 1978), así como también lo hizo la vimentina, otra de las proteínas relacionadas con la astrogliosis (Dahl y cols., 1981; Schnitzer y cols., 1981). Asimismo, muchos otros marcadores astrocitarios fueron descritos en esta época, como la proteína S-100, identificada por Moore (1965) y expresada preferentemente en astrocitos (Matus y Mughal, 1975; Ludwin y cols., 1976; Cocchia, 1981; Ghandour y cols., 1981), el antígeno C1, que caracteriza principalmente a la glia de Bergmann (o células epiteliales de Golgi) y células de Müller en retina adulta (Sommer y cols., 1981), el antígeno M1 (Lagenaur y cols., 1980), específico de astrocitos protoplásmicos y fibrosos y los anticuerpos A2B5 y Ran-2, usados extensivamente en los trabajos de Raff y cols. (Bartlett y cols., 1981; Raff y cols., 1983a, 1983b; Miller y Raff, 1984). Como será descrito posteriormente (ver Identidad y funciones astrocitarias), el anticuerpo monoclonal A2B5, que reconoce varios gangliósidos en el tejido nervioso (Fredman y cols., 1984), fue utilizado para diferenciar las dos clases de astrocitos que aparecen en los cultivos (Raff y cols., 1983a).

Respecto a la historia reciente de la glia radial, Mugnaini y Forströen (1967) describieron, mediante microscopía electrónica, la presencia de neuronas bipolares que, apoyadas en las fibras de Bergmann, migraban verticalmente en la corteza cerebelar del embrión de pollo. Asimismo, combinado el método de Golgi con las técnicas de microscopía electrónica, Rakic (1971a) describió en mono que las células granulares del cerebelo estaban directa y consistentemente apoyadas en vertical sobre las fibras de Bergmann durante la migración a través de la capa molecular, concluyendo que “la relación neurona-glia, aparentemente proporciona condiciones necesarias para la migración de las células granulares jóvenes” (**Figura 4**). Después completaría estos estudios observando que las neuronas jóvenes abrazaban las fibras radiales durante su migración

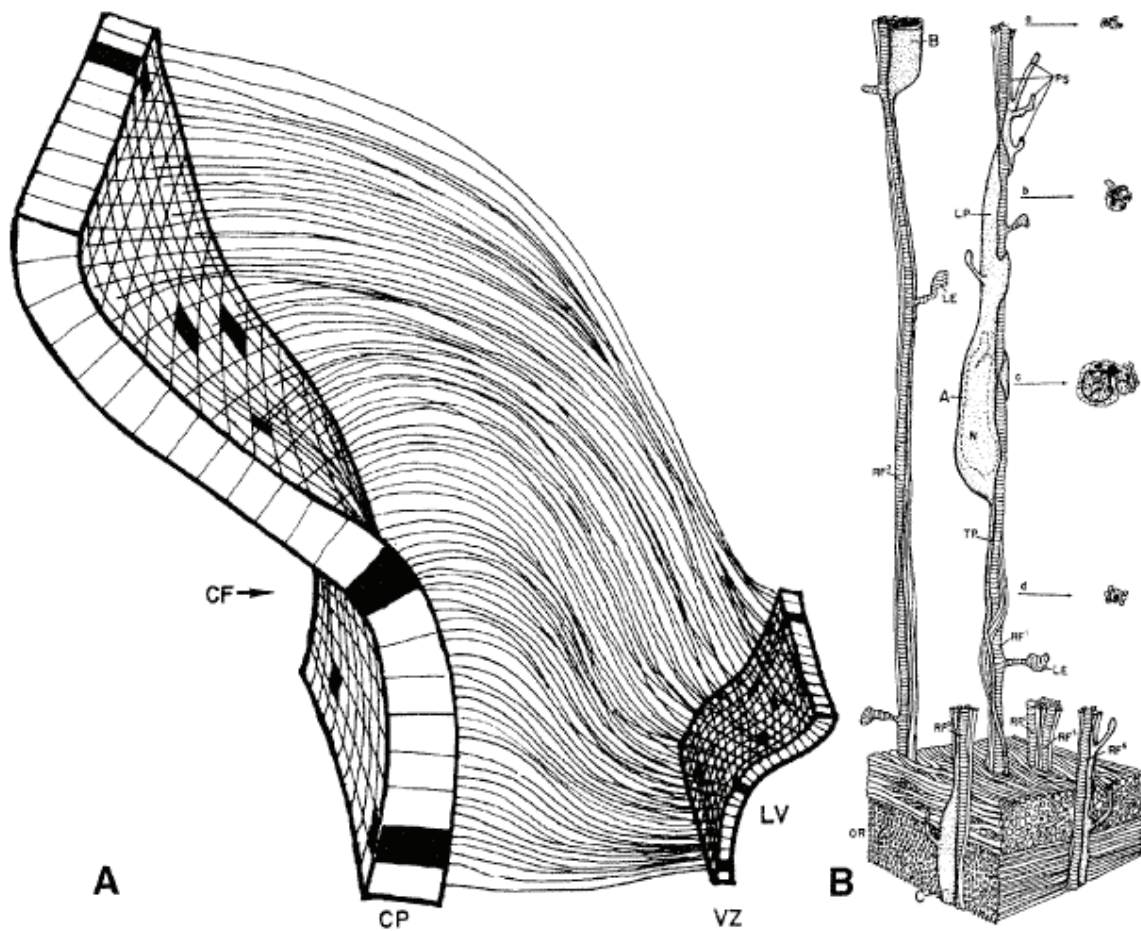


Figura 4. Esquemas de la disposición de la glía radial. A. Vista esquemática tridimensional de una reconstrucción la pared medial cerebral a la fisura calcarina incipiente en un feto de mono de 80 días. **B.** Disposición de los neuroblastos que abrazan los procesos radiales (Extraído de Rakic, 2003).

y que esta interacción dinámica confería una direccionalidad precisa a la migración neuronal, que permitía la organización columnar vertical del neocortex adulto (Rakic, 1971b, 1972) (Figura 4). Finalmente, los estudios más recientes han confirmado mediante inmunohistoquímica la naturaleza glial de las fibras radiales (Levitt y Rakic, 1980; Levitt y cols., 1981), así como su importantísima labor en la generación de la mayor parte de células cerebrales (Noctor y cols., 2001).

ii. Historia del tercer elemento y otros tipos gliales.

El tremendo uso que le dio Cajal al método de Golgi, le permitió describir algunas células pequeñas que aparentemente no tenían procesos (Cajal, 1896). Debido a su gran asociación con somas neuronales, las llamó “células satélite”, considerándolas un nuevo tipo de célula glial. Aplicando técnicas alternativas de tinción confirmó la presencia de estas células también cerca de astrocitos, vasos sanguíneos y sustancia blanca, agrupándolas en lo que denominó “tercer elemento” (el primero eran las neuronas y el segundo los astrocitos). Pero incluso más que Cajal,

fue uno de sus discípulos, Río Hortega (1919, 1920) quien más contribuyó al conocimiento de ese “tercer elemento”. De hecho, utilizando los caprichosos métodos argénticos, descubrió que dicho elemento estaba en realidad formado por dos tipos celulares distintos: microglia y glía interfascicular.

Río-Hortega propuso que la microglía, al contrario que otros tipos neurales, tenía un origen mesodérmico. Esto sería posteriormente confirmado por Kershman (1939) quien dijo que la microglia eran células mesenquimales originadas de las meninges y los vasos sanguíneos. Su origen y función distinta llevó a Río-Hortega a considerar realmente a la microglía como el tercer elemento del sistema nervioso. En estas descripciones, las células de microglia fueron distinguidas por unos procesos profusamente ramificados, así como por sus propiedades migratorias y su aparente actividad fagocítica. De hecho Río-Hortega (Kettenmann y Ransom, 2005) describió también la transformación de la microglia desde un estado inactivo a la forma ameboide fagocítica y su transformación final en células granulares en respuesta a ciertas amenazas como infecciones.

Tras los primeros trabajos de Río-Hortega en microglía, Cajal se centró en estudiar este tipo celular aplicando distintos métodos, lo cual le llevó redefinir otro tipo de células adendríticas como el “verdadero tercer elemento” (García-Marín y cols., 2007). Posteriormente Río-Hortega lo identificó con el nombre de oligodendroglia (del griego pocos-árbol-pegamento; después lo cambiaría por oligodendrocitos para reconocer que eran células) y propuso que tenían un origen neuroectodérmico. No obstante, este tipo celular probablemente había sido teñido antes por Cajal (1913) y Robertson (1897, 1899), quien describió células con algunos procesos cortos, no asociadas con vasos sanguíneos y las llamó mesoglia para indicar que probablemente venían del mesodermo. Tanto Río-Hortega como otros autores describieron después la existencia de varios tipos de oligodendrocitos (Río-Hortega, 1928; Kryspin-Exner, 1943; Cammermeyer, 1960) correspondiendo con distintos estadios de diferenciación del linaje de oligodendrocitos. Por otra parte, Río Hortega (1928) ya demostró una clara asociación entre oligodendrocitos y mielina, término introducido por Virchow (1858) para referirse a la “grasienta” envuelta que rodea a algunos axones, y postuló la similaridad funcional de oligodendrocitos y células de Schwann (Río Hortega, 1925). Además sugirió que los oligodendrocitos producían la mielina y no los axones como se pensó durante mucho tiempo. Años después esto se confirmaría por microscopía electrónica (Kettenmann y Ransom, 2005).

C. EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES GLIALES

El marco evolutivo contiene todas las respuestas sobre el “cómo” y el “por qué” de cualquier concepto en biología. De esta forma, el estudio evolutivo también proporciona el contexto ideal y necesario para comprender cualquier concepto relacionado con la aparición de fenotipos gliales y de sus consencuencias. Aunque debido a la falta de evidencia fósil este estudio se basa fundamentalmente en aproximaciones indirectas de distinto tipo, las preguntas más interesantes nos llevan al estudio de organismos ancestrales ya que es dónde se encuentran las respuestas sobre

el modo de aparición de la glía y sus funciones primogenias. Dichos métodos indirectos tratarán de acercarse a la filogenia de la glía basándose en criterios morfológicos, citológicos, moleculares y funcionales. Aparte de la metodología, el primer requisito para poder analizar y comparar las poblaciones gliales entre organismos muy distintos, es tener una definición precisa de lo que se considera glía, con el fin de evitar errores de interpretación. A pesar de que clásicamente la glía ha sido definida por lo que no puede hacer (por ejemplo, comunicarse mediante potenciales de acción), la definición que plantean Radojcic y Pentreath (1979) por la que el término glía debiera ser restringido únicamente a aquellas células no neuronales con origen ectodérmico y que tienen una relación íntima con las neuronas, o separan el compartimento neuronal de los elementos mesodérmicos, permite concretar el objeto de estudio y consituye un punto excelente para analizar en qué momento de la escala evolutiva surge por primera vez la glía.

i. ¿Cuándo y cuántas veces aparece la glía en la evolución?

Una de las razones por las que esta pregunta es fundamental radica en que indirectamente puede informarnos sobre la utilidad de la glía a lo largo de la evolución. La aproximación más lógica para responderla consistiría en trazar el punto evolutivo antes del cual no se podría concebir por definición la existencia de glía. Según esa definición, el límite por debajo para la aparición de la glía debe ser, por necesidad, la aparición de un sistema nervioso. Entre los *Metazoa* anteriores a los *Bilateria*, ni *Poriphera* (incluyendo esponjas) ni *Placozoa* tienen sistemas nerviosos (Miller y Ball, 2006) ni organización en capas blastodérmicas. Asimismo, los *Ctenophora* tienen un plexo subepidermal general de neuronas con axones elongados, pero no van acompañados por ningún tipo de células que pudiera calificarse como glía (Bullock y Horridge, 1965). Los *Cnidaria*, que al igual que los *Ctenophora* también son diblásticos (con dos capas blastodérmicas, ectodermo y endodermo), poseen una red nerviosa bien desarrollada en la epidermis y otra en la gastrodermis con comunicación con el estomodeo y en varios puntos a través de la mesoglea (Bullock y Horridge, 1965; Mackie, 2003). A pesar de que estos organismos transmiten impulsos nerviosos y presentan sinapsis, ni axones ni somas están asociados con ningún tipo de células con función glial (Horridge y cols., 1962; Bullock y Horridge, 1965; Lentz y Barnett, 1965; Radojcic y Pentreath, 1979). Únicamente en las escifomedusas (*Cnidaria*) se han descrito, en los ganglios de los cuerpos marginales, células similares a glía, a pesar de que su relación con la glía de los *Bilateria*, no es muy clara si es que existe alguna (Bullock y Horridge, 1965). Esto nos lleva a un importante concepto: la mayoría de funciones nerviosas fueron anteriores a la aparición de la glía.

Una vez situado el límite por debajo, se hace necesario saber a partir de qué grupos existen claramente poblaciones gliales de acuerdo a la definición. En este punto hay que considerar la salvedad de que los miembros vivos de ciertos grupos animales no tienen por qué parecerse a sus representantes ancestrales, pudiendo haber evolucionado después, lo cual puede llevar a

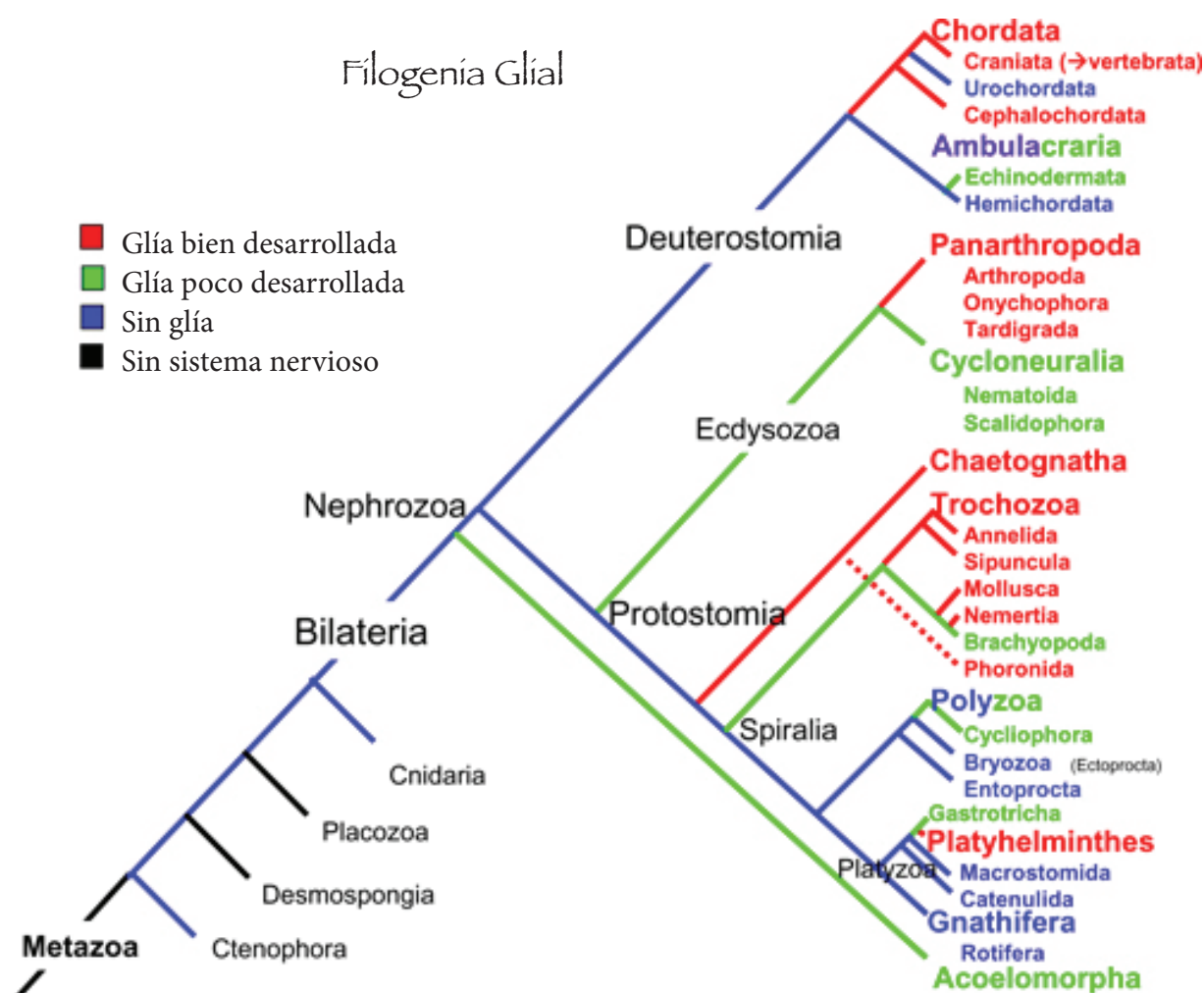


Figura 5. Esquema sobre la aparición de la glía en la filogenia (Extraído de Hartline, 2011).

conclusiones inciertas. Así pues y dentro de los *Metazoa*, analizando los taxones más derivados en la evolución en cada una de las ramas de *Eubilateria* (*Bilateria* típicos sin considerar los acoelomorpha) se puede comprobar fácilmente la presencia de neuronas en gran asociación con células de soporte no nerviosas o tejido conectivo definidas como “glía”. Además de los vertebrados, que reflejan la máxima expresión de las funciones gliales (y en las que nos centraremos en otros apartados), muchos grupos de invertebrados también reflejan la complejidad de las funciones gliales tal y como las conocemos en vertebrados. Este es el caso de insectos, arácnidos más avanzados y decápodos Crustacea, los cuales incluso poseen una barrera hematoencefálica que está formada por células gliales, a diferencia de vertebrados dónde se forma por células endoteliales (revisado en Abbott y cols., 1986b). Otra función propia de la glía de vertebrados, la recaptura de neurotransmisores, se ha descrito en la unión neuromuscular de artrópodos (Faeder y Salpeter, 1970; Horwitz y Orkand, 1980). Por tanto, es bastante claro que es precisamente en los *Bilateria* donde se dan la mayor complejidad y diversidad de poblaciones y funciones gliales. Y ya que este grupo engloba todos los organismos más o menos complejos que conocemos, no es mucho decir.

Profundizando en este grupo y analizando sus representantes más basales para reducir el rango

posible dónde se originaron las primeras poblaciones gliales, parece claro que existen muchos taxones que o bien carecen de glía o bien su desarrollo es realmente escaso. Esto sucede por ejemplo con los *Cycloneuralia*, pertenecientes al grupo de los *Ecdysozoa*. Dentro de dicho subgrupo, los *Priapulida* y *Loricifera*, que por pertenecer a la subdivisión de los *Scalidophora* parecen reflejar mejor las condiciones primitivas del grupo (Hartline, 2011) solamente poseen unas células descritas como similares a tanicitos. Incluso eso es más de lo que se observa en los *Kinorhyncha* (también del grupo de los *Scalidophora*) donde no se ha descrito ninguna manifestación de glía. Así pues, otros subgrupos basales de los *Bilateria* como los *Hemichordata*, pertenecientes a los *Deuterostomia*, carecen completamente de glía. La discontinua presencia y ausencia de glía en la parte basal del grupo de los *Bilateria*, ilustrada en la **Figura 5**, hace llegar a otra cuestión importante: ¿Ha sido la glía “inventada” por la evolución en varias ocasiones? ¿O existe un antecesor común en el cual aparece la glía y luego otros grupos la pierden puntualmente?. La respuesta a esta pregunta es fundamental para entender la necesidad de la glía en la evolución.

Suponiendo que la actual clasificación de los diversos grupos sea correcta, esta pregunta lleva al grupo de los *Acoelomorpha*, gusanos planos intersticiales con una organización muy simple que habitan en sedimentos y a los que actualmente se les sitúa en la base de la filogenia de los *Bilateria* (**Figura 6**. Hejnol y cols., 2009). Estos organismos presentan un sistema nervioso bilateral bien desarrollado con un órgano frontal, un protocerebro y nervios longitudinales unidos por numerosas comisuras. Pues bien, mediante microscopía electrónica se identificó



Figura 6. Acoelomorpha (Fuente: Dr Bernhard Egger, UCL).

un tipo celular (Bedini y Lanfranchi, 1991), con muy pocos orgánulos y algunas “proyecciones atenuadas extendiéndose hacia el sistema nervioso que le rodea” que fue considerado ser similar a la glía descrita en Planarias (Hartline, 2011). Asimismo, Bery y cols. (2010) describieron en un acelo (*Acoelomorpha*) juvenil, *Symsagittifera roscoffensis*, la presencia de células electro-densas con procesos lamelados gruesos con forma irregular parecidos a los de otros tipos gliales, apareciendo además en regiones de neuritas del neuropilo medular. Además, también describieron procesos electrón-densos, que además de ser muy similares a los de la glía, formaron envueltas parciales alrededor y dentro de nervios. De confirmarse estos resultados y asumiendo como correcta la clasificación filogenética actual, parece ser que los *Acoelomorpha* constituyen el ancestro común que adquiere en la evolución los primeros tipos gliales, siendo después heredados por el resto de *Bilateria* y perdidos puntualmente en algunos de ellos. Además, asumiendo estas hipótesis, la desaparición de la glía en algunos organismos indicaría que al menos tal protoglia no sería muy necesaria. Sin embargo, si esta hipótesis no es cierta, la respuesta se inclinaría más porque la glía ha aparecido

varias veces a lo largo de la evolución en grupos filogénicos distintos en la rama de los *Bilateria*. Si eso es cierto, la aparición de la glía de forma independiente en distintos organismos con sistemas nerviosos cada vez más complejos reflejaría que la glía no es una casualidad evolutiva, sino más bien una necesidad (Hartline, 2011).

ii. ¿Cómo aparecieron las primeras poblaciones gliales en la evolución?

La función es la causa que conduce evolutivamente a la generación de nuevas morfologías y tipos celulares. Como se tratará en otros apartados, la glía cumple infinidad de funciones en sus formas más complejas, lo que en cierto modo implica la existencia de una gran diversidad de tipos celulares para llevarlas a cabo. Hipotéticamente, en un extremo cada tipo glial podría proceder de apariciones independientes de glía en la evolución, mientras en el otro extremo una única aparición de fenotipos gliales podría haberse diversificado y acumulado cada vez más funciones complejas. Pero, ¿qué posibles funciones pueden haber sido las funciones primigenias?. Para responder a esta pregunta hay que tener en cuenta que cuando la función requiere una estructura compleja que haya tenido que evolucionar de estados intermedios, estos estados han tenido que ser adaptativos (Hartline, 2011). Un ejemplo es una posible función homeostática como hoy la conocemos, que controla el medio externo neuronal para ayudar a mantener sus requisitos mínimos. Para esta función homeostática, las células gliales debieran rodear completamente a las neuronas o perderían el control del medio extracelular a través de difusión. Pero hasta que esta envoltura no sea extensa, no parece que exista ninguna ventaja en poseerla, lo cual hace pensar que esta función no fue decisiva, tal y cómo la conocemos, en la aparición de la glía. Lo mismo ocurre con las funciones de recaptura de transmisores, señalización, aislamiento eléctrico y la función metabólica/nutritiva, si bien esta última se ha sugerido en glía de gusanos planos (Littlewood y Bray, 2000). Por su relación con la función homeostática y el control completo del medio, en estos casos las formas intermedias tampoco habrán tenido muchas ventajas. Por tanto, la explicación para este tipo de funciones es que la envuelta completa debiera haberse generado después de una envuelta ancestral creada para otros propósitos (Hartline, 2011). Esto hace posible que una envuelta función primitiva y no muy elaborada pudiera ser una de las funciones primigenias. Otra de las posibles funciones primigenias podría haber sido la eliminación de residuos de neuronas, aunque ésta es más dudosa ya que la mayor parte de invertebrados presentan un sistema circulatorio abierto y solo tendría utilidad en animales de mayor tamaño (Hartline, 2011). Basado en datos sobre *Platyhelminthes* y *Cnidaria* en los que el crecimiento y organización de axones se produce en ausencia de glía, todo parece indicar que la guía axonal y otras funciones relacionadas con el desarrollo tampoco parecen ser la función primigenia (Hartline, 2011). Algo similar ocurre con la función fagocítica, la cual a pesar de que en planarias se han descrito posibles vacuolas fagocíticas (Golubev, 1988) cuesta pensar que constituyese una función ancestral, entre otras razones porque no se han observado inclusiones citoplásmicas propias de células fagocíticas

en organismos basales y porque la existencia de macrófagos especializados para llevar a cabo esta función hace replantearse la utilidad de una función glial de fagocitosis.

Una de las funciones primigenias más probables podría haber sido el soporte estructural, que deriva de la necesidad de impedir deformaciones y daños en los nervios. La evidencia de esta función reside en el extensivo sistema de estructuras adhesivas intercelulares y la ocurrencia de filamentos intermedios, microfibrillas y microtúbulos en las células gliales, incluso primitivas. De hecho, en platelmintos se observan microtúbulos, un signo de la función temprana de soporte estructural (Golubev, 1988). No obstante, aunque es fácil asignar esta función a anélidos y moluscos, ya que carecen de cualquier tipo de esqueleto, resulta muy difícil explicar su necesidad en artrópodos con exoesqueleto (Radojcic y Pentreath, 1979). Además, muchos de los *Bilateria* basales con cuerpos blandos no presentan movimientos violentos que requiriesen un gran soporte estructural, mientras que por otra parte, existen gusanos planos de la subclase rhabdocoela (*Platyhelminthes*) que no tienen glía y sí que muestran esos movimientos cuando capturan larvas de mosquito y dáfidos (Wrona y Koopowitz, 1998). Algo similar ocurre con la probóscide de los enteropneustos (*Hemichordata*) que a pesar de usarse para cavar agujeros, su innervación carece de glía. Sin embargo, a pesar de algunas evidencias en contra, parece difícil no asignar un papel de soporte a la células del neuroepitelio de equinodermos, muy similares a glía radial que tienen grandes haces de fibras. Por tanto, debido a los ejemplos de esta función en *Bilateria* muy basales y a que en principio esta función no parece requerir muchos estadios intermedios para ser útil, todo hace pensar que fue una de las primeras funciones de la glía (Hartline, 2011). Si esto fue así, todo hace pensar que algunas funciones secundarias podrían haberse empezado a acumular sobre las estructuras y características celulares creadas por la función de soporte estructural.

Una aspecto que tienen en común los taxones sin glía o en los que ésta es rudimentaria, es que poseen sistemas nerviosos basiepiteliales (Hartline, 2011). Desde este punto de vista, es razonable asumir que la glía tiene un origen a partir de células epidermales que envolvían a las neuronas, de células de soporte metabólico o de células de soporte estructural. A medida que el sistema nervioso evoluciona y toma posiciones más profundas en el cuerpo, se crea un universo distinto de necesidades, como por ejemplo un sistema indirecto de aportación de nutrientes y eliminación de desechos o un soporte estructural no conjuntivo. Esto haría que células de soporte estructural (o quizá también algunas con una función primitiva de envoltura o soporte trófico), evolucionasen para suplir esas nuevas necesidades, bien acumulando varias de estas funciones o estableciendo caminos independientes que produjesen la diversidad de glía que se observa en la actualidad (Hartline, 2011).

iii. ¿Por qué surge la glía durante la evolución?

Aunque se ha discutido sobre algunos aspectos de cómo, asociada a funciones primitivas, aparece la glía en la evolución, poco se ha hablado sobre su necesidad y sobre las razones que sostienen tal aparición. Así pues, una de las razones que podría hacer necesaria alguna forma

de glía podría ser el aumento del tamaño del tejido nervioso. A pesar de que varios de los taxones que carecen de glía (*Rotifera*, *Kinorhyncha*, *Bryozoa*) tienden a ser pequeños (en la escala de milímetros), otros organismos basales de tamaño similar como los priapulidos (Rehkamper y cols., 1989) y los locíferanos (Kristensen, 1991) poseen formas reconocibles de glía. Otro ejemplo que va contra esta relación es el caso de los medusozoans (medusas) que teniendo redes nerviosas que se extienden por metros y neuronas individuales de al menos varias veces el tamaño de otros organismos con glía, funcionan muy bien sin glía. Por tanto no parece que el tamaño del sistema nervioso sea un factor determinante en la aparición de las poblaciones gliales. Otra posible causa de la aparición de la glía en la evolución podría ser que, en general, los sistemas nerviosos evolucionan cada vez a ser más compactos. Esto podría impedir el acceso por difusión de nutrientes, iones e impedir la eliminación de los residuos. Pero algunos organismos como los rotíferos, que carecen de glía, sí que tienen un sistema nervioso modestamente compacto (Bullock y Horridge, 1965). Además en algunos invertebrados de pequeño tamaño (centímetros) se ha visto que no existe un gran impedimento a la difusión entre células (Kuffler, 1967). La complejidad del sistema nervioso también podrían tener relevancia en la aparición de la glía. De hecho entre los platelmintos, las tricládidos, con poblaciones gliales desarrolladas, tienen un sistema nervioso más complejo que los basales rhabdocelos que carecen de glía (Golubev, 1988). Esto también ocurre con los cefalocordados basales, donde una mayor complejidad del sistema nervioso se asocia a la presencia de glía. Algo similar ocurre con los hemicordados más derivados, los cuales tienen sistemas nerviosos más simples y ausencia de glía. Así pues, hay organismos como los urocordados cuya forma adulta sésil no tiene glía (Koyama y Kusunoki, 1993) mientras que el estadio larvario posee células endodermales (Meinertzhagen y cols., 2004). No obstante, esta evidencia no es clara ya que hay organismos más simples como los acelomorfos con glía y otros más complejos como los platelmintos que no la tienen (Bullock y Horridge, 1965). Por otra parte, existen platelmintos que se convierten en parásitos sedentarios en la edad adulta pero que poseen poblaciones gliales bien desarrolladas (Biserova y cols., 2010). Estos y otros ejemplos muestran que tampoco parece existir una relación directa entre la complejidad del sistema nervioso y la existencia de glía. Por tanto, todo hace pensar que sea una combinación de estos factores y de las posibles funciones primogénitas la razón para la aparición de glía o su pérdida durante la evolución.

D. TIPOS GLIALES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

i. Macroglia

Corresponde al tipo glial más abundante y con mayor diversidad en el cerebro. Fue definido por comparación con la microglía en base a que poseen un mayor tamaño celular.

a. Astroglia

Aunque suele admitir cierta confusión, en este trabajo incluimos bajo este término a las

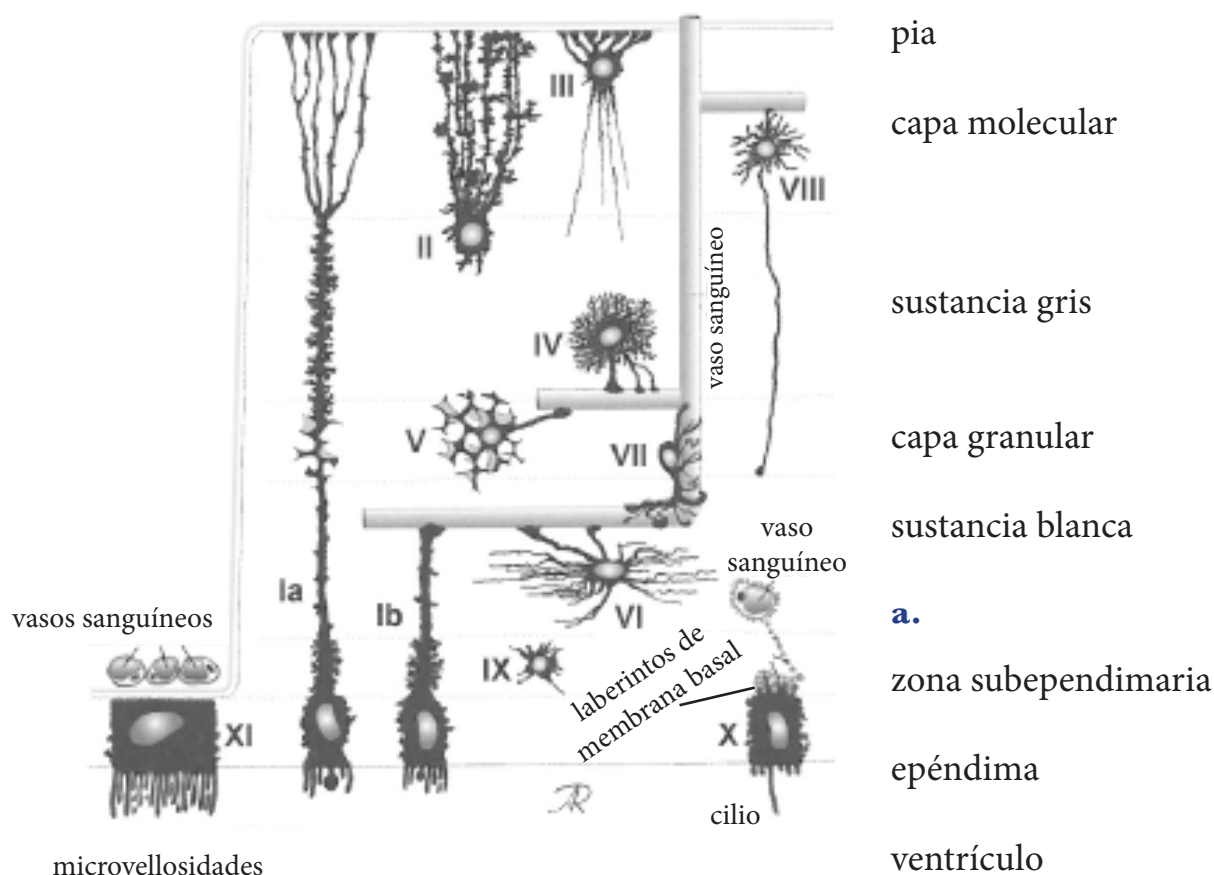


Figura 7. Esquema sobre los distintos tipos de células astrogiales (incluyendo ependimoglia) y su localización en las distintas capas y regiones del sistema nervioso central. I: Tanicito (a: pial; b: vascular); II: astrocito radial (glía de Bergmann); III: astrocito marginal; IV: astrocito protoplásmico; V: astrocito velado; VI: astrocito fibroso; VII: astrocito perivascular; VIII: astrocito interlaminar; IX: astrocito inmaduro; X: ependimocito; XI: célula de los plexos coroideos (Modificado de Reichenbach y Wolburg, 2005).

poblaciones de glía radial, astrocitos y glía ependimaria. Esta definición no es casual ya que se basa en que comparten muchos aspectos comunes como el origen a partir de la transformación de glía radial (Schmechel y Rakic, 1979; Spassky y cols., 2005), la expresión de algunos marcadores comunes (Levitt y Rakic, 1980; Bodega y cols., 1994) o la presencia de pies terminales que contactan una lámina basal alrededor de vasos sanguíneos/pia mater o cuerpo vítreo del ojo (Reichenbach y Wolburg, 2005), lo cual les diferencia de otras poblaciones macrogliales como los oligodendrocitos. Asimismo, también usaremos el término astroglia para referirnos a las poblaciones astrocitarias en cultivo, ya que son una fenotipo similar pero distinto a los astrocitos encontrados en el sistema nervioso.

• Glía Radial

Presentes durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano (revisado en Rakic, 2003), poseen un soma en la zona ventricular, desde el que se extiende un proceso radial largo desde su

cuerpo celular a la membrana basal de la superficie pial (ver Figura 4). A medida que el grosor radial de la pared neural se incrementa por la generación de células, estos procesos también se extienden e incluso cambian su dirección sin perder el componente radial. En función de su ciclo celular experimentan una migración de su núcleo y citoplasma a lo largo del eje radial de la capa ventricular (sin perder sus anclajes), conocida con el nombre de migración nuclear intercinética (Tramontin y cols., 2003). Una de las razones por las que son más conocidas es por el hecho de que durante el desarrollo embrionario generan neuronas que migran a lo largo de sus procesos radiales, siendo ésto crucial para la expansión de la corteza cerebral que se produce en la evolución (Rakic, 2003). Además, durante las últimas fases del desarrollo estas células se transforman en astrocitos y endotelio, con los que tienen una gran similitud como la expresión de GFAP o el acoplamiento por uniones tipo GAP. La persistencia de tanicitos y células de Müller se considera persistencia de glía radial en el sistema nervioso central maduro.

• Ependimoglia

Suelen incluirse en el término glía astroglia porque derivan de glía radial (Spassky y cols., 2005) y comparten algunas propiedades astrocitarias como cierta expresión de GFAP y Vimentina, al menos en algunos organismos (Bodega y cols., 1994). Son las células que limitan con los ventrículos cerebrales (revisado en Reichenbach y Wolburg, 2005). La mayoría son cuboidales y multiciliadas. Constituyen el límite entre el parénquima cerebral y las cavidades ventriculares. En su polo basal contactan con remanentes de vasos sanguíneos embrionarios (también llamados laberintos de membrana basal). En su polo opuesto, situado en el lumen ventricular, se localizan los cilios que juegan un papel decisivo en la propulsión del líquido ceforraquídeo a través del sistema ventricular. Se ha sugerido además que estas células filtran moléculas cerebrales, aíslan al cerebro de sustancias potencialmente dañinas en el líquido ceforraquídeo, mueven desechos celulares y optimizan la dispersión de mensajeros neurales en dicho líquido. Se generan entre E14 y E16 a partir de glía radial aunque no se diferencian y adquieren los cilios hasta la primera semana postnatal. (Spassky y cols., 2005)

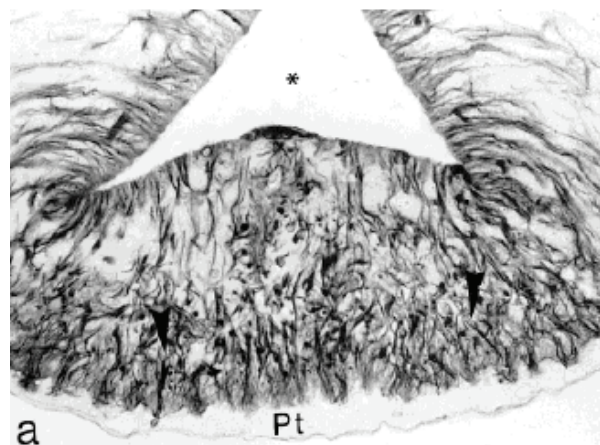


Figura 8. Tanicitos en la neurohipófisis del Gerbo de Mongolia inmunoteñidos para GFAP (Extraído de Wittkowski, 1998).

• **Tanicitos:** Están relacionados con los endotelios y también expresan marcadores astrogliales como GFAP y Vimentina (**Figura 8**. Revisado en Reichenbach y Robinson, 1995). Constituyen el tipo más común de macroglía en el SNC de vertebrados inferiores. En mamíferos adultos se restringen a regiones del cerebro como los órganos periventriculares, tallo de la

hipófisis, velum medullare o la región del rafe espinal. Sus largos procesos suelen conectar el epéndimo, con la superficie cerebral o con vasos sanguíneos (Wittkowski, 1998). En rata se han descrito hasta cuatro subtipos distintos, con especialización en sus funciones (Rodríguez y cols., 2005). Dependiendo del subtipo pueden actuar como una barrera al líquido cefalorraquídeo, transportar moléculas desde el líquido cerebroaraquídeo al sistema vascular portal hipotálamo-hipofisario, recibir innervación peptidérgica y aminérgica, intervenir en la regulación de la liberación de GnRH o funcionar como progenitores neuronales (Rodríguez y cols., 2005).

• **Células de Müller**

Las células de Müller se pueden considerar la glía radial de la retina. En muchos vertebrados incluyendo mamíferos con retina avascular, estas células constituyen las únicas representantes de la macroglia (revisado en Reichenbach y Wolburg, 2005). Cada célula de Müller envuelve y soporta un grupo columnar de neuronas retinales. De hecho contactan con todos los somas y procesos neuronales. Su tamaño y forma es distinto en función de la especie de la que se trate. Estas células establecen una unión anatómica y funcional entre las neuronas y los espacios con los que éstas necesitan intercambiar moléculas, como los vasos sanguíneos retinales, el cuerpo vítreo y el espacio subretinal. Estas células llevan a cabo por sí solas las funciones que en otras zonas del SNC implican la acción concertada de astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales. Entre sus funciones (revisado en Bringmann y cols., 2006) se encuentran el participar en el metabolismo de la glucosa, eliminar sustancias de desecho, regular el flujo sanguíneo, contribuir en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica y tomar parte en los procesos de señalización neuronal recapturando y reciclando neurotransmisores así como proporcionando precursores de neurotransmisores a las neuronas. Además mantienen la homeostasis iónica, de agua y de pH y liberan factores de todo tipo. Pueden también actuar como moduladores de respuesta inmune llegando incluso a fagocitar otras células y son reactivas en respuesta a alteraciones patológicas de la retina. Asimismo participan en procesos de desarrollo de la retina como andamiaje. Todas estas funciones se reflejan en la asociación entre la patología retiniana y deficiencias en estas células como ocurre en el edema macular.

• **Glía de Bergmann**

Estas células, también denominadas células epiteliales de Golgi son una forma de astrocitos radiales presente en el cerebelo de todos los vertebrados (revisado Reichenbach y Wolburg, 2005; López-Bayghen y cols., 2007). Sus cuerpos celulares se sitúan en la capa de somas de células de Purkinje y sus procesos cruzan la capa molecular, siendo parecidos a los de los astrocitos protoplásmicos. Estos procesos forman empalizadas paralelas al eje mayor de cada pliegue cerebeloso. Al igual que las células de Müller, la glía de Bergmann es en cierto modo una excepción ya que puede considerarse glía radial en estadio adulto. De modo similar a la glía radial, participan en la migración celular y se especula con su potencial neurogénico. Asimismo, estas células

suelen ser consideradas como un tipo de astrocito especializado y al igual que los astrocitos se acoplan vía uniones tipo GAP, envuelven sinapsis, promueven sinaptogénesis y participan en el mantenimiento y función sináptica, respondiendo a la actividad de las fibras paralelas y trepadoras por la activación de corrientes mediadas por receptores AMPA y de transporte de glutamato.

- **Astroцитos protoplásmicos**

En la clasificación clásica, los astrocitos protoplásmicos constituyen uno de los dos subtipos de astrocitos, que además de ser el más numeroso constituye uno de los tipos astrocitarios mejor estudiados (revisado en Wang y Bordey, 2008). Se localizan en la sustancia gris y presentan varias ramificaciones gruesas de las que parten finísimos procesos que les dan una apariencia similar a una esponja. En prácticamente la totalidad de la población astrocitaria, al menos uno de los procesos de cada célula termina en pies vasculares de modo que los vasos sanguíneos están completamente envueltos por pies astrocitarios (Foo y cols., 2011). Como ocurre con otros tipos astrogiales, los astrocitos protoplásmicos se conectan entre sí por uniones GAP, formando extensos sincitios (revisado en Scemes y Spray, 2009). Otra de las características de los astrocitos protoplásmicos es que establecen cada uno se dispone en un dominio exclusivo en el que no existen procesos de otros astrocitos (Bushong y cols., 2002).

- **Astroцитos fibrosos**

Constituyen el otro tipo de astrocitos según la clasificación clásica. Están presentes en la sustancia blanca, nervio óptico y capa de fibras nerviosas de la retina vascularizada de mamíferos (revisado en Privat y cols., 1995; Reichenbach y Wolburg, 2005). Sus somas se suelen distribuir en hileras entre los haces de axones y presentan procesos gruesos que apenas se ramifican. Todos los astrocitos fibrosos en nervio óptico murino poseen varios pies subpiales o perivasculares. Asimismo, los procesos de los astrocitos fibrosos son generalmente más largos que los de los protoplásmicos pero tienen una menor relación superficie/volumen. Al contrario que los protoplásmicos, no se organizan en dominios exclusivos (Sun y cols., 2010).

- **Astroцитos velados**

Similares a los astrocitos protoplásmicos salvo por su morfología, se encuentran generalmente en regiones donde hay muchas neuronas pequeñas densamente empaquetadas (revisado en Privat y cols., 1995; Reichenbach y Wolburg, 2005). De hecho fueron inicialmente descritos en la capa granular cerebelosa, donde cada uno rodea varias células granulares pequeñas adquiriendo morfologías en forma de velo proyectado tridimensionalmente. Asimismo también han sido descritos en los glomérulos olfativos, donde envuelven a células periglomerulares (Valverde y Lopez-Mascaraque, 1991) y en hipocampo (Emsley y Macklis, 2006). Comparado con otros tipos astrocitarios, los astrocitos velados presentan además un ratio muy alto de superficie/volumen ($20\text{-}30\ \mu\text{m}^{-1}$).

- **Astrocitos radiales**

Son comunes en la médula espinal, cerebro de vertebrados inferiores y nervio óptico de mamíferos, aunque no queda claro que se trate en todos los casos del mismo tipo (revisado en Privat y cols., 1995; Reichenbach y Wolburg, 2005). Como su nombre indica, presentan procesos radiales que suelen lindar con la pía, aunque también se ha descrito un subtipo con procesos velados. A pesar de que en el hipocampo de mamíferos se han encontrado astrocitos orientados radialmente, éstos no parecen constituir el mismo tipo que el de vertebrados inferiores.

- **Astrocitos interlaminares**

Este subtipo parece ser específico de las capas supragranulares de la corteza cerebral de primates superiores incluyendo humanos (revisado en Privat y cols., 1995; Reichenbach y Wolburg, 2005). Se encuentran densamente empaquetados. A pesar de ser parecidos a los astrocitos protoplásmicos, extienden un largo proceso de hasta 1 mm hacia la lámina II y IV, donde terminan en un pequeño bulbo formando empalizadas, generalmente en el neuropilo y ocasionalmente en la vasculatura. También envían procesos hacia la superficie pial donde contribuyen a la glia limitans. No suelen respetar los territorios de los astrocitos protoplásmicos. Su función hasta hoy es desconocida.

- **Glia Marginal**

Se encuentran cerca de la pia mater donde forman varias capas con sus pies terminales (revisado en Privat y cols., 1995; Reichenbach y Wolburg, 2005). Además suelen extender varios procesos largos y lisos en el neuropilo, aunque su papel principal parece ser formar una barrera de glía. Presentan procesos lamelares que pueden apilarse, por lo que sus dominios son completamente solapantes (Holen, 2011). Por microscopía electrónica se ha visto que suelen existir más de 20 capas de lamelas que curiosamente son similares a las que existen en cicatrices gliales (Holen, 2011). Estudios en neocortex e hipocampo han mostrado que la capa más superficial de la glia limitans, pegada a la pía, tiene características únicas que incluyen una lámina basal que cubre la superficie del cerebro así como concentraciones de complejos transmembrana especializados (revisado en Feig y Haberly, 2011). La presencia de fenestraciones en la pia mater permite la libre difusión de agua, iones y moléculas de señalización entre la glia limitans y las arterias piales que se encuentran dentro del fluido cerebroespinal del espacio subaracnoideo. También se han descrito una población de astrocitos muy relacionados con la glia marginal en la corteza piriforme posterior de la rata, llamados astrocitos asociados a superficie (Howe y cols., 2008; Feig y Haberly, 2011).

b. Oligodendroglia

Son las células del SNC homólogas a las células de Schwann en el SNP (para una revisión, Szuchet, 1995; Butt, 2005). Se definen como aquellas células que producen envueltas de mielina que envuelven y aíslan los axones del SNC (**Figura 9**). Establecen dominios longitudinales

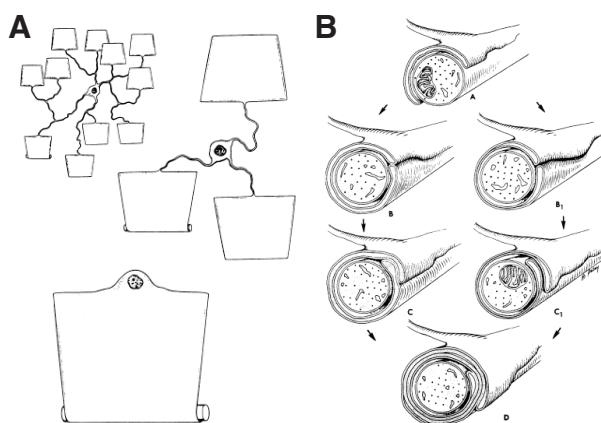


Figura 9. Esquema sobre la morfología de los oligodendrocitos. A. Morfología teórica de un oligodendrocito desenrollado del axón. **B.** Conformación del arrollamiento de los procesos oligodendrocíticos sobre el axón.

clasificó en distintos subtipos basándose en las características y orientación de sus procesos, la forma y tamaño de sus somas, el tamaño de los axones con los que se asocian y sus distribuciones dentro del SNC.

• **Oligodendrocitos tipo I y II:**

Los oligodendrocitos de tipo I y II son prácticamente indistinguibles entre sí y tienen cuatro o más procesos primarios finos que se ramifican repetidamente para mielinizar entre 10 y 30 axones de menos de 2 μm de diámetro. Mientras que los de tipo I tienen somas esféricas o ligeramente poligonales (15 a 20 μm), los de tipo II tienen formas poligonales o cuboidales (20 a 40 μm) con menos procesos y más gruesos que los de tipo I. A diferencia de los de tipo I que pueden ser encontrados en el prosencéfalo, cerebelo y médula espinal, los de tipo II se observan únicamente en sustancia blanca.

• **Oligodendrocitos tipo III**

Los oligodendrocitos tipo III tienen grandes cuerpos celulares. Frecuentemente se concentran directamente en un axón y presentan uno o más procesos primarios gruesos que raramente se ramifican. Mielinizan un reducido número de axones pequeños, usualmente menos de cinco, con diámetros desde 4 a 15 μm . Se encuentran localizados en los pedúnculos cerebrales y cerebelares, la médula oblonga y la médula espinal.

c. **Oligodendrocitos tipo IV**

Los de tipo IV son similares a los tipo III pero no tienen procesos y forman envueltas de mielina largas y únicas sobre una fibra de gran diámetro (al menos más de 4 μm); están restringidos a tractos espinales que contienen las fibras de mayor diámetro y suelen disponerse cerca de las raíces nerviosas. La rareza de los oligodendrocitos de tipo IV en roedores puede estar relacionada con

de mielina que flanquean otros dominios sin mielina llamados nodos de Ranvier. Precisamente en estos nodos es donde se regenera el impulso nervioso dando lugar a lo que se conoce como conducción saltatoria. En las regiones paranodales (que flanquean los nodos de Ranvier), existe una gran concentración de canales de sodio. La longitud internodal y la periodicidad de los nodos de Ranvier son relativamente constantes en un axón determinado, dependiendo del diámetro. La variabilidad morfológica es un tema recurrente en el estudio de los oligodendrocitos desde los tiempos de Rio Hortega (1928) que los

el modesto tamaño de las fibras de mayor diámetro en comparación a pollo y animales mayores.

Adicionalmente a los tipos detallados hasta ahora, también se han descrito oligodendrocitos no mielinizantes como los oligodendrocitos satélite, los cuales se disponen cerca de las neuronas y pueden servir para la regulación de su microambiente.

d. Polidendrocitos o células NG2

Sin duda alguna, estas células representan el tipo glial menos estudiado y más enigmático que existe en el cerebro (revisado en Butt, 2005; Richardson y cols., 2011). La historia de estas células comienza hace unos treinta años cuando se definieron principalmente por su expresión del proteoglicano condroitín sulfato NG2. Usando anticuerpos para esta proteína, se descubrió que una red continua de células NG2 se extendía por todas partes del cerebro adulto y médula espinal. Su abundancia y distribución ubicua fue tan chocante que han

venido a clasificarse como el quinto tipo neural del cerebro. Su morfología se caracteriza por somas pequeños y algunos procesos no muy ramificados, siendo similar en sustancia gris y blanca (**Figura 10**). No obstante, en la sustancia blanca además extienden procesos a lo largo de los axones donde contactan con los nodos de Ranvier (Butt y cols., 1999).

Relacionadas en todo momento con este linaje (Richardson y cols., 2011), estas células generan oligodendrocitos durante el desarrollo y en casos de desmielinización en el cerebro adulto, aunque no existe evidencia que todas ellas actúen como progenitores de oligodendrocitos en desarrollo y adulto. De hecho su distribución uniforme entre sustancia gris y blanca no encaja con su perfil de progenitores de oligodendrocitos, ya que de serlo, parecería más lógico pensar que se concentrasen en sustancia blanca, donde hay más demanda de mielinización. Otras de las razones para pensar que su función no sea únicamente la de actuar como progenitores de oligodendrocitos, es su alta densidad en cerebros adultos donde no parece existir gran requerimiento de recambio, así como en la capa molecular del cerebelo donde los oligodendrocitos no se desarrollan. Por otra parte, los datos en cultivo revelaron (Kondo y Raff, 2000) que pueden generar astrocitos de tipo-2 que a su vez generarían neuroesferas que darían lugar a colonias conteniendo una mezcla de neuronas, oligodendrocitos y astrocitos tipo-1. Sin embargo, hasta ahora estudios in vivo basados en el mapeo de poblaciones con la estrategia Cre-Lox (Richardson y cols., 2011) parece indicar que en el cerebro adulto control, solo producen oligodendrocitos.

Durante el desarrollo y en el caso del cerebro lesionado, existe una subpoblación de células NG2 que también produce astrocitos (Tatsumi y cols., 2008). Estas conexiones en el linaje han

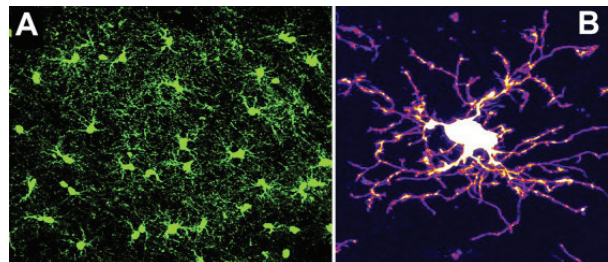


Figura 10. Células NG2 o polidendrocitos.

A. Imagen a bajo aumento de un marcaje en la corteza cerebral de un ratón Sox10-GFP de edad P13. **B.** Polidendrocito en el cerebelo de un ratón de edad P45 llenado con Alexa 488 para revelar su morfología completa (Extraído de Rivers y cols., 2008).

hecho que tradicionalmente se les haya relacionado con los astrocitos. Incluso, basándose en la ontogenia del perfil electrofisiológico astrocitario, se ha llegado a postular la idea de que corresponden a un tipo de astrocito (Walz, 2000; Matthias y cols., 2003). Estas ideas se han visto además reforzadas por la expresión de ciertos marcadores astrocitarios como una leve activación del promotor del GFAP (Nolte y cols., 2001; Matthias y cols., 2003).

Por último, una hipótesis excitante sobre su función relaciona el hecho de que expresen canales iónicos y receptores de neurotransmisores con el hecho de que reciben entrada sináptica desde neuronas (Bergles y cols., 2000), especulando con un posible papel en el procesamiento de información (Richardson y cols., 2011).

e. Células de glía envolvente

Se restringen al sistema olfativo primario y parecen ser un tipo único de células gliales (revisado Su y Cheng, 2010). Una de sus características principales es que envuelven a los axones olfativos que proyectan desde el epitelio al bulbo olfativo, contribuyendo al crecimiento y guía de los axones olfativos durante el desarrollo, pero también durante el recambio de neuronas sensoriales olfativas que ocurre a través de toda la etapa adulta (**Figura 11**). Basándose en sus propiedades como promotoras del crecimiento axonal, han sido utilizadas en múltiples ocasiones en terapia de lesiones neurales (Chehrehasa y cols., 2010). Su origen es único porque parecen derivar de placoda olfativa (Blanchart y cols., 2011), a diferencia del resto de glía del SNC (que deriva del tubo neural o del mesodermo) y SNP (que deriva de la cresta neural). De hecho derivan directamente del ectodermo de la placoda olfativa como demuestra el hecho de que no expresan marcadores de células derivadas de tubo neural como el antígeno A4. Asimismo, podrían estar formadas por subpoblaciones con propiedades específicas ya que algunas exhiben morfologías elongadas, extendiendo procesos finos laminares que envuelven axones olfativos, mientras otras tienen una forma redondeada y no envuelven axones. Poner dibujos de Facundo.

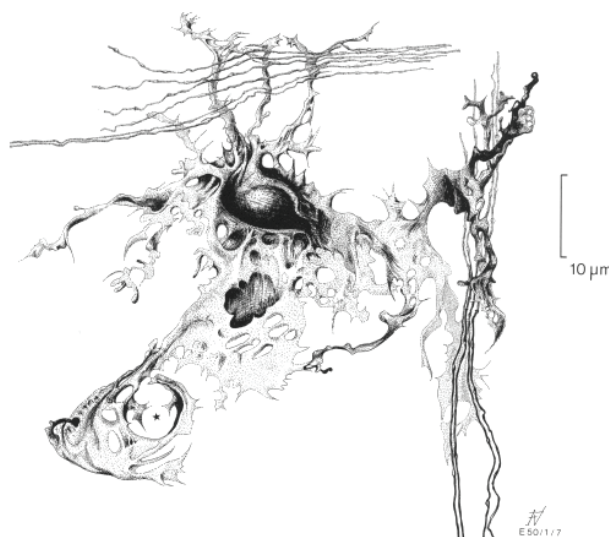


Figura 11. Dibujo a cámara lúcida de una célula de glía envolvente en la capa del nervio olfativo del erizo. Sus procesos laminares se extienden desde el cuerpo celular y envuelven los fascículos de fibras olfativas (Extraído de Valverde y López-Mascaraque, 1991).

ii. Microglia

Constituyen entre un 5% y un 20% de la población glial del SNC, siendo similar su número al de las neuronas (revisado en Streit, 2005; Prinz y Mildner, 2011; Saijo y Glass, 2011). Actúan

como macrófagos respondiendo a estímulos infecciosos y traumáticos. Se distribuyen ubicuamente aunque las densidades más altas se encuentran en el hipocampo, el telencéfalo olfativo, porciones de los ganglios basales y la sustancia negra. En el cerebro sano estas células se designan como microglia en reposo, para distinguirla de la reactiva o activada que aparece después de una lesión. La microglia en reposo tiene una forma característica marcada por procesos finamente ramificados que se extienden en todas las direcciones. Su morfología ramificada la distingue de otros tipos de macrófagos. Esta morfología refleja su función como sensores en la búsqueda de cambios bioquímicos o bioeléctricos en su microambiente. Mientras que la microglia de la sustancia gris es ramificada en todas las direcciones, las células en la sustancia blanca alinean sus procesos paralelos o perpendiculares a los haces de nervios. Asimismo ambas poblaciones establecen dominios escasamente solapantes.

En el adulto estas células pueden asumir tres estados claramente identificables (**Figura 12**; revisado en Streit, 2005): 1) microglia en reposo (ramificadas); 2) microglia activada o reactiva que aparece en estados patológicos pero no es fagocítica y 3) microglia fagocítica que aparece como macrófagos redondos. Además, existen células de microglia satélite que envuelven los somas de algunas neuronas y podrían participar como soporte trófico, o incluso estar implicadas en remodelación de contactos sinápticos. La microglia activada produce muchos mediadores pro-inflamatorios y su función como sistema inmune del cerebro reconcilia la discrepancia entre la ausencia de leucocitos en el cerebro y la habilidad del cerebro para defenderse contra infecciones, daños y enfermedad.

La relación de linaje de la microglía con los macrófagos es clara (revisado por Prinz y Mildner, 2011). Su origen es hematopoyético (mesodermo), invadiendo el parénquima del SNC cuando la neurulación ha sido completada, de modo que aparecen incluso antes de que el neuroectodermo esté vascularizado. Otros trabajos recientes sugieren además que una subpoblación de microglía podría originarse de macrófagos del saco vitelino que migran al SNC durante la embriogénesis temprana. Así pues, en etapa embrionaria la microglía se describe como macrófagos fetales que

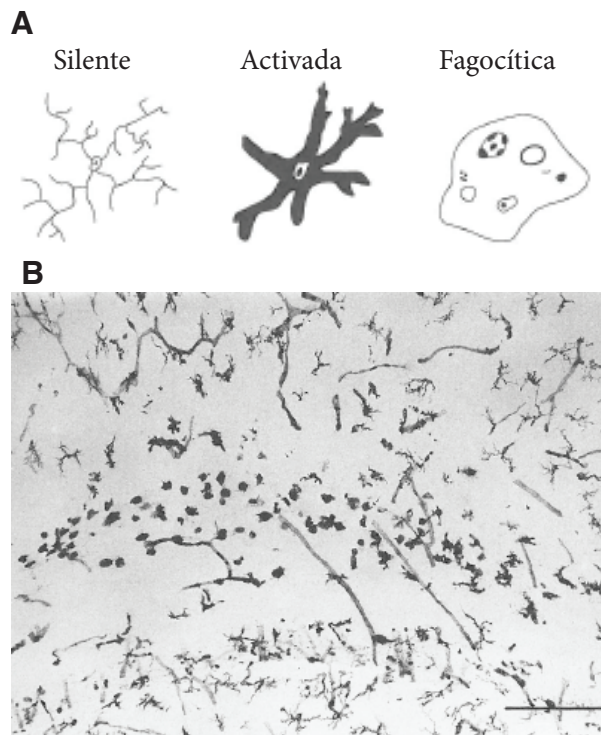


Figura 12. Microglía (Modificado de Streit, 1995). **A.** Morfologías de células microgliales en sus distintos estados de activación. **B.** Marcaje microglial con B₄-isolectina (*Griffonia simplicifolia*) en el que se muestra un grupo de células microgliales ameboides en la región supraventricular del cuerpo calloso (centro de la imagen), rodeadas por otras morfologías microgliales más ramificadas. Escala = 200 μ m.

afloran sobre E8 en el cerebro de roedores e incrementan su número más de 20 veces en el desarrollo postnatal temprano. Después de esto, la mitosis microglial en el SNC normal ocurre con baja tasa pero garantiza un continuo recambio. Asimismo, la detección de microglía derivada del donador en ratones irradiados a los que se les ha trasplantado médula ósea soporta la idea de que las células derivadas de la médula ósea podrían migrar al SNC y dar lugar también a microglía.

E. IDENTIDAD Y FUNCIONES ASTROCITARIAS

i. IDENTIDAD

Generalmente cuando se describe un astrocito, se suele hacer referencia al tipo protoplásmico debido a su abundancia y a su presencia en las regiones más estudiadas del sistema nervioso. En este trabajo se asumirá dicha simplificación salvo que se indique lo contrario. Aún así, concretando el tipo de astrocito que será estudiado, muchos trabajos han clasificado dentro del mismo grupo a distintos objetos de estudio. Esto lleva a la necesidad de definir el objeto de estudio en base a criterios experimentales. Si bien las definiciones empíricas dependen de las observaciones y por tanto constituyen un trabajo siempre en progreso, no debiera resultar muy distinto de las clasificaciones clásicas de plantas y animales (Kimmelberg, 2009). Sin embargo es difícil establecer el número de propiedades suficiente para definir a una célula como un astrocito.

En un plano más práctico, los astrocitos han sido tradicionalmente identificados por lo que no tienen (como la identificación de Deiters en base a que no tenían axón, ver Antecedentes históricos de la glía) o por lo que no hacen (como por ejemplo no disparar potenciales de acción). Sin embargo esta definición es vaga ya que basta que exista otro tipo celular sin alguna de esas características para que sea incorrecta. Una buena forma de definir lo que es un

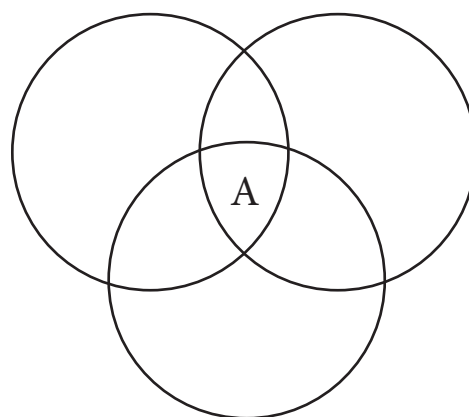


Figura 13. Diagrama de Venn sobre la identidad astrocitaria (Modificado de Kimmelberg, 2009). Cada círculo representa un tipo de población astrocitaria, (simplificado a tres poblaciones pero podría haber muchas más). La parte indicada con la letra A constituyen el mínimo de propiedades necesarias para que una célula sea considerada un astrocito.

astrocito es mediante un diagrama del tipo que se muestra en la **Figura 13**. De este modo, todo lo que se considere astrogliá debiera tener al menos un conjunto de características mínimas a nivel morfológico, funcional, de expresión de moléculas o de activación de promotores para poder incluirse en esa categoría (**Figura 14**).

En un comienzo y basándose en los marcajes con impregnaciones de metales con afinidad por los filamentos intermedios, los astrocitos fueron descritos como células con morfología estrellada,

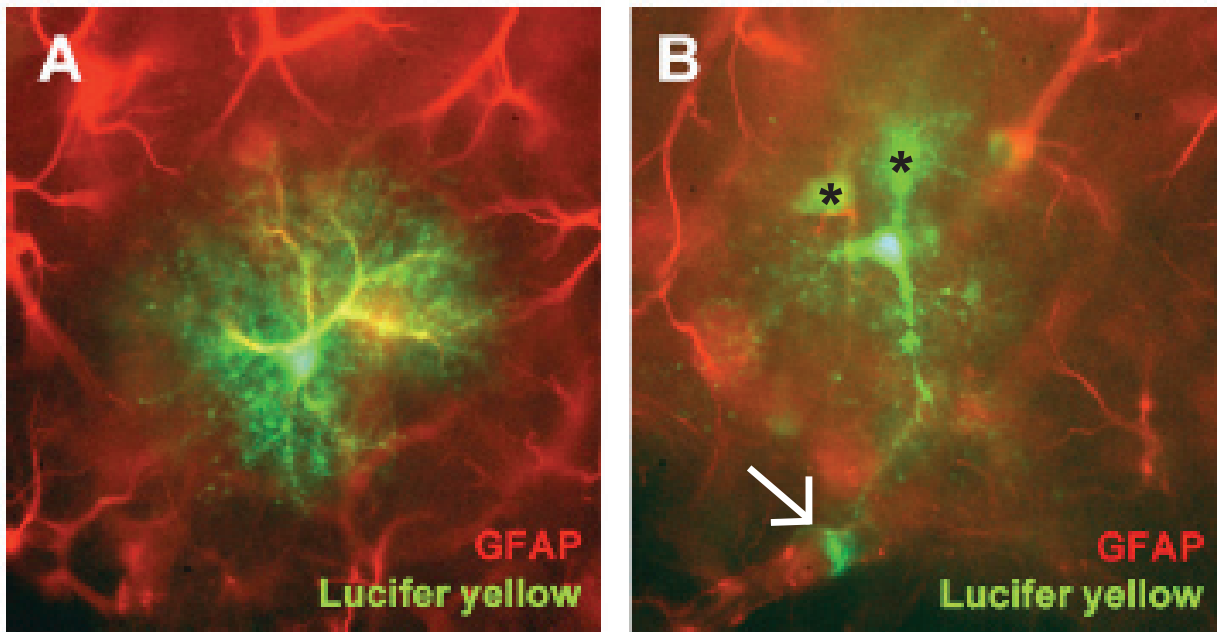


Figura 14. Morfología de un astrocito protoplásmico revelada por un inmunomarcaje para GFAP y una inyección del colorante Lucifer yellow (Modificado de Wang y Bordey, 2008). **A.** Astrocito que expresa GFAP pero no está conectado aparentemente por uniones tipo GAP, una de las características esenciales astrocitarias. **B.** Astrocito que no expresa el marcador astrocitario GFAP pero que está conectado a otros astrocitos (asteriscos) por uniones tipo GAP y emite un proceso hacia un vaso sanguíneo (flecha). Esto pone de manifiesto la necesidad de una identificación multifactorial. Nótese además la distinta morfología entre un astrocito completo y el marcaje que revela la inmunohistoquímica para GFAP.

de lo cual procede el término astrocito (del griego astron = estrella y kytos = vaso hueco, cavidad). Este error se mantuvo cuando aparecieron los marcajes inmunohistoquímicos para la proteína GFAP, la cual está presente únicamente en procesos primarios y secundarios. Sin embargo, la morfología astrocitaria es más bien con forma de esponja (Nedergaard y cols., 2003; **Figura 14, Figura 17**). Por tanto, el retrato robot de un astrocito sería el de una célula cuya morfología se basa en un soma pequeño, del cual parten unos pocos procesos de mayor tamaño que se ramifican sucesivamente en procesos cada vez más pequeños y que quedan restringidos a un dominio esférico no solapante entre células (Bushong y cols., 2002). Prácticamente todos los astrocitos poseen procesos con pies terminales que envuelven vasos sanguíneos (**Figura 17**; Foo y cols., 2011). En tinciones de rutina con hematoxilina y eosina, los astrocitos se distinguen por su marcaje pálido con núcleos ovales/redondos (protoplásmicos) o lobulados (fibrosos) y con poco citoplasma aparente, diferenciándose de las neuronas en que su nucléolo es casi indiscernible (Montgomery, 1994).

Desde un punto de vista molecular (revisado en Kimelberg, 2009) los astrocitos generalmente se distinguen por su expresión de GFAP, GS, S100 β , aldehído deshidrogenasa (miembro L1 de la familia 1M; Aldh1L1) y serina racemasa. Dado que el GFAP solo se encuentra en los procesos más gruesos, bajo una inmunotinción para esta proteína, los astrocitos aparecen únicamente

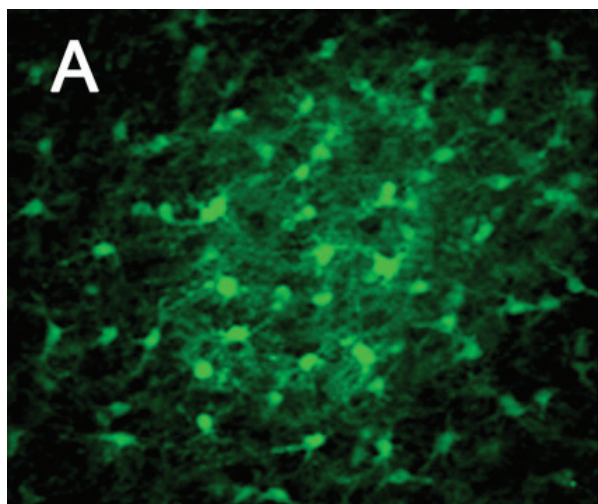


Figura 15. Acoplamiento entre astrocitos a través de uniones tipo GAP mostrado por la inyección de biocitina por patch-clamp y su posterior revelado (Extraído de Houades y cols., 2008).

oligosacáridos, aminoácidos, nucleótidos, pequeños péptidos y ciertos factores tróficos, todos ellos con un peso molecular menor que 1000 Da (revisado en Scemes y Spray, 2009). Asimismo presentan un perfil electrofisiológico caracterizado por una baja resistencia de membrana y una relación corriente-voltaje lineal (**Figura 16**).

Este tipo correspondería a los astrocitos pasivos, sin embargo se han descrito astrocitos activos, con respuestas no lineales, que hoy en día se cree que son en realidad células NG2 (Matthias y cols., 2003; Nishiyama y cols., 2005).

Atendiendo a sus propiedades ultraestructurales discernibles por microscopía electrónica, los astrocitos son cualitativamente bastante homogéneos (**Figura 17**; Privat y cols., 1995). Su núcleo es regular en su forma, aunque en algunos posee pequeñas incisiones. Con fijaciones aldehídicas el nucleoplasma aparece finamente granular con una distinta condensación de cromatina a lo largo de la envuelta nuclear, la cual muestra numerosos poros. El fondo citoplásmico del pericarion (región que rodea al núcleo) es menos denso que el de neuronas y oligodendrocitos y es pobre en ribosomas libres. Esto le da un tono claro,

como ramificaciones de procesos gruesos, sin que se permita observar los procesos finos que le dan su aspecto típico. Así pues, también es característica su expresión de transportadores de aminoácido excitatorios, principalmente los subtipos para Glutamato EAAT1 (GLAST; también de L-aspartato) y EAAT2 (GLT-1), así como la expresión de receptores de Glutamato (principalmente del subtipo AMPA) y de GABA (subtipo GABA_A).

Otra propiedad característica de los astrocitos es que forman extensos dominios de acoplamiento por uniones tipo GAP (**Figura 15**; en astrocitos están formadas principalmente por conexina 43 y suelen ser astrocito-astrocito) que permiten el intercambio de pequeñas moléculas como iones,

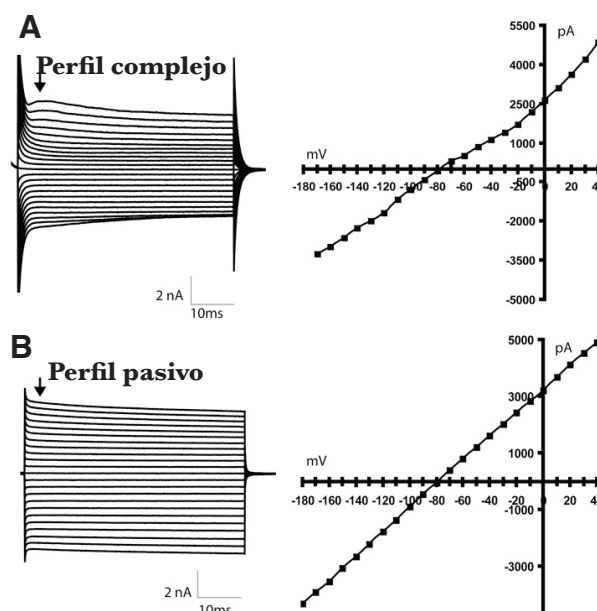


Figura 16. Perfiles electrofisiológicos que se han asociado a los astrocitos (Modificado de Kimelberg, 2009 2006). **A.** Perfil complejo caracterizado por una respuesta no lineal entre el voltaje y la corriente. Este perfil parece corresponder en realidad a células NG2 y no a astrocitos. **B.** Perfil pasivo típico de los astrocitos. Se caracteriza por una respuesta lineal que sigue la ley de Ohm.

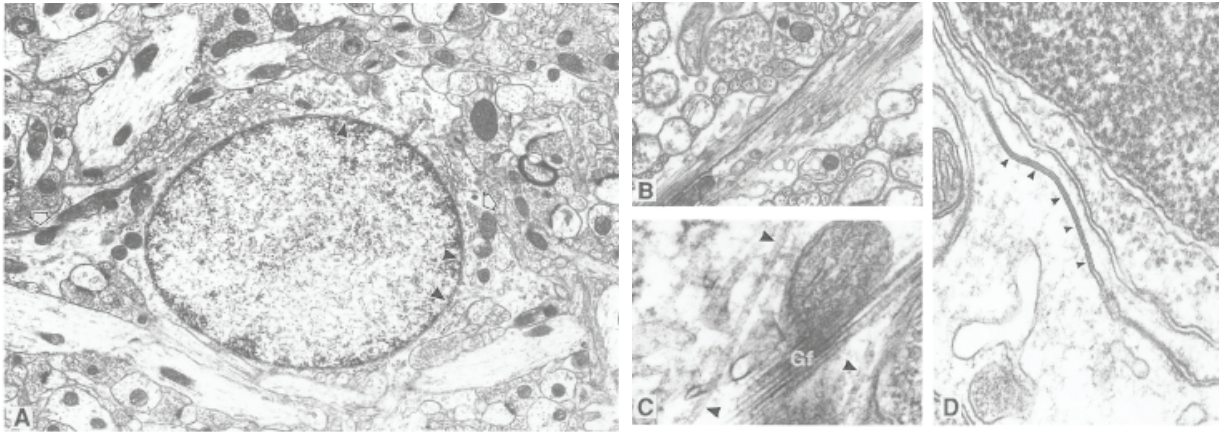


Figura 16. Imágenes por microscopía electrónica de células astrogiales (Extraído de Privat y cols., 1995). **A.** Astrocito protoplásmico. **B.** Detalle de una célula de Bergmann que muestra los haces de gliofilamentos. **C.** Haces de gliofilamentos en un astrocito protoplásmico. **D.** Unión de tipo GAP entre procesos astrogiales.

característico de estas células. Las cisternas del retículo endoplásmico rugoso son generalmente cortas con membranas bien delineadas en un fondo claro y un contenido que parece más denso que el del fondo citoplásmico. La región del Golgi no es muy extensa, pero está bien delineada en una posición juxtánuclear. Las mitocondrias aparecen frecuentemente menos densas que las de las neuronas. El contorno citoplásmico es extremadamente irregular. Pero lo más característico es la presencia de gliofilamentos de 8 a 10 nm de diámetro. Asimismo, además de las uniones tipo GAP se pueden observar otro tipo de especialización de membrana llamada ensamblaje ortogonal, presente únicamente en astrocitos y endoteliales. Estas especializaciones, que se pueden ver únicamente por criofractura, consisten en matrices paracristalinas de subunidades de 7 nm que se muestran como partículas en el lado P y pequeños agujeros en el lado E de la membrana. Son abundantes en las aposiciones de las superficies astrocitarias con tejido mesenquimal (principalmente en pies subpiales y vasculares). Su función no es muy clara aunque podrían ser importantes para la adhesión celular y transporte de distintas moléculas.

La morfología característica de los astrocitos *in vivo* difiere muy significativamente de la que se puede observar en cultivos. *In vitro* se han descrito dos tipos de astroglia que fueron llamados tipo 1 y tipo 2 (Raff y cols., 1983a; Levison y McCarthy, 1991). Mientras que el tipo 1 suele presentar morfología poligonal (en torno a un 80%) y se caracteriza por la expresión de GFAP y la ausencia del antígeno de A2B5, el tipo 2 exhibe una morfología estrellada con procesos GFAP y A2B5 positivos. No obstante, a pesar de haberse intentado extrapolar esta clasificación a los subtipos protoplásmicos (tipo 1) y fibrosos (tipo 2) observados *in vivo*, esto no parece muy correcto y por tanto es mejor diferenciar ambos tipos de clasificación (Levison y McCarthy, 1991).

ii. FUNCIONES EN EL CEREBRO

Desde un punto de vista general, la función principal de los astrocitos consiste en crear un

microambiente perfecto para que las neuronas hagan lo que tienen que hacer. Esto incluye un abanico tremendo de funcionalidades precisas, desde proporcionar soporte estructural hasta participar en la defensa del cerebro en caso de infecciones. Estas funciones son fundamentales para el cerebro, lo cual parece reflejarse en la tendencia evolutiva a aumentar el ratio de astrocito por neurona (Nedergaard y cols., 2003).

a. Soporte estructural

El papel de los astrocitos como soporte estructural fue una de las primeras funciones atribuidas a la glía tanto por la evolución (como hemos visto parece constituir una de las funciones ancestrales de la glía) como en la historia de los estudios gliales. Tanto es así que el término glía procede de un vocablo griego (γλία) que significa pegamento. Esto contrasta con la escasa atención que recibe actualmente esta función en beneficio de otras funciones más “exóticas”. Esta función sería llevada a cabo pasivamente debido a su presencia casi ubicua y al alto contenido en filamentos intermedios y microtúbulos o activamente a través de la liberación de proteínas de matriz extracelular como lamininas (Liesi y cols., 1983), fibronectina (Price y Hynes, 1985), colágenos (Heck y cols., 2003) y Sparc (Mendis y cols., 1995) entre otras (ver Expresión de genes de adhesión y matriz extracelular en Resultados).

b. Control del pH, osmolaridad y concentración de iones extracelulares

La despolarización que ocurre durante la neurotransmisión resulta en cambios potencialmente dramáticos en el pH, osmolaridad y concentración extracelular de iones del microambiente neuronal. Estos cambios deben ser estrictamente controlados para la correcta función cerebral, algo en lo que los astrocitos juegan un papel fundamental. Un ejemplo de esta función en los astrocitos es la presencia de anhidrasa carbónica, la cual podría jugar un papel primordial en el control del pH. También lo es la expresión del intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, el cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ o el de Na^+/H^+ , los cuales producen la liberación o recaptura de H^+ y HCO_3^- . Del mismo modo, también están implicados los sistemas de recaptura de neurotransmisores como los de glutamato, que mediados por el gradiente de Na^+ también pueden transportar H^+ dentro de la célula, lo cual compensaría la liberación de H^+ que ocurre desde las vesículas sinápticas durante la liberación de Glutamato. A estos mecanismos habría que añadir que los astrocitos también contienen canales de Na^+ , Cl^- , HCO_3^- y Ca^{2+} . Uno de los ejemplos mejor estudiados sobre estas funciones homeostáticas, lo constituye la función de tamponado de los niveles de K^+ extracelular. Durante la actividad neuronal normal, la neurotransmisión conlleva liberación de K^+ al medio extracelular. Si esto no se corrigiera se produciría la depolarización neuronal e hiperexcitabilidad. Pues bien, según se ha demostrado en rodajas de cerebro, los astrocitos actuarían tomando el exceso de K^+ y lo distribuirían a través del sincitio astrocitario, llevándolo a regiones con menor concentración de K^+ o directamente al torrente sanguíneo (Holthoff y Witte, 2000; Newman, 1986). Para llevar a cabo esta función poseen cotransportadores pasivos y canales como los Kir

(de potasio) y a menor extensión también mecanismos activos como ATPasas de Na^+/K^+ ó K^+/Cl^- (Ballanyi y cols., 1987; Karwoski y cols., 1989).

c. Soporte metabólico y eliminación de residuos

Como se explicó anteriormente (ver Antecedentes históricos de la glía), esta función fue sugerida por primera vez por Golgi hace más de 100 años, al proponer que los astrocitos proporcionaban el ambiente nutritivo necesario para la supervivencia neuronal. En un principio se pensaba que los astrocitos tomaban la glucosa de la sangre a través de los transportadores de glucosa presentes en los pies terminales que envuelven a los vasos sanguíneos, poniéndola directamente a disposición de las neuronas. Sin embargo existe mucha controversia al respecto (Wang y Bordey, 2008). Otro mecanismo propuesto ha sido que actuarían como fuentes de energía en forma de glicógeno, el cual sería usado en casos de alta demanda como la que se produce cuando existe alta actividad neuronal. Además de la presencia de gránulos de glicógeno, los astrocitos poseen las enzimas para su síntesis (glicógeno sintasa), así como aquellas que lo metabolizan (glicógeno fosforilasa) (Pellegrini y cols., 1996; Pfeiffer-Guglielmi y cols., 2003). Sin perjuicio de estos mecanismos, también se ha propuesto que actúen liberando lactato, el cual sería capturado y metabolizado por las neuronas (Pellerin y Magistretti, 1994).

Respecto a la eliminación de residuos cabe destacar su acción neuroprotectora, capturando el exceso de amonio y glutamato y su conversión a glutamina. Además los astrocitos también participan en la captura de ciertos metales pesados (Struzynska y cols., 2001). Asimismo, también contienen proteínas que unen metales como las metalotioneínas, las cuales tienen un importante papel neuroprotector tras lesión o exposición a metales tóxicos (Aschner, 1997; Chung y cols., 2008).

d. Recaptura de neurotransmisores

La acción de los neurotransmisores puede ser finalizada por rotura, difusión, unión o recaptura, procesos que afectan tremendamente a la transmisión sináptica. La posición de estrecho contacto con las sinapsis y la elevada expresión de los transportadores implicados en unión y recaptura de neurotransmisores, hace de los astrocitos las células más implicadas en estos procesos. De hecho los astrocitos *in vivo* expresan transportadores de tipo GAT (Gadea y Lopez-Colome, 2001), GLAST y GLT (Anderson y Swanson, 2000) y GlyT1, para la recaptura de GABA, Glutamato y Glicina respectivamente. También se ha demostrado la recaptura de alta afinidad de histamina (Husztai, 1998) aunque no queda claro a través de qué mecanismo. En cultivos además, expresan transportadores de otros neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, serotonina y adenosina, aunque su presencia *in vivo* no ha sido confirmada.

e. Funciones relacionadas con el desarrollo

Aunque su origen ontogénico es bastante tardío, los astrocitos y los progenitores astrocitarios llevan a cabo importantes papeles en la determinación de ciertos procesos de morfogénesis temprana y en ciertos procesos asociados al desarrollo en adulto. A través de la liberación de distintas proteínas de matriz extracelular, los astrocitos pueden participar en la creación de fronteras para los axones o para la migración celular. Entre las proteínas de este tipo se encuentran las lamininas (Liesi y cols., 1983, 1985; Liesi y Silver, 1988; Chiu y cols., 1991; Shea y cols., 1992), N-Cadherina (Neugebauer y cols., 1988; Tomaselli y cols., 1988), NCAM (Neugebauer y cols., 1988; Smith y cols., 1990) y fibronectina (Price & Hynes, 1985; Liesi y cols., 1986; Matthiessen y cols., 1989) entre otras. Otras de las familias de proteínas liberadas por los astrocitos e implicadas en estos procesos son los proteoglicanos, sobre todo estableciendo fronteras para los axones durante el desarrollo (García-Abreu y cols., 1995, 2000), así como ciertas enzimas proteolíticas, en particular las metaloproteinasas de matriz (Wells y cols., 1996; Muir y cols., 2002), que juegan un papel primordial en la degradación y remodelado de la matriz extracelular. Pero además, la liberación in vitro de factores de crecimiento que incluyen NGF, BDNF, neurotrofina-3 (Rudge y cols., 1992) y FGF (Vaca y Wend, 1992), también sugiere un mecanismo por el que los astrocitos podrían influir en la maduración y supervivencia neuronal (para revisión Ojeda y cols., 2000). Tanto es así, que el co-cultivo de las neuronas con astrocitos se utiliza para permitir la supervivencia neuronal (Goslin y Banker, 1991). Por último, también se ha demostrado que participan en la sinaptogénesis, la cual coincide temporalmente con la generación de astrocitos, mediante, entre otros mecanismos, las trombospondinas que inducen in vivo la formación de sinapsis (Christopherson y cols., 2005).

f. Funciones inmunes

Los astrocitos actúan como puente entre el SNC y el sistema inmune. En particular pueden fagocitar células y actuar como células presentadoras de antígenos (Montgomery, 1994). De hecho pueden expresar antígenos del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II así como moléculas co-estimuladoras que son críticas para la presentación del antígeno y la activación de células T (Farina y cols., 2007). También se ha visto que los astrocitos expresan receptores implicados en la inmunidad innata, como los receptores Toll-like (Farina y cols., 2007) y producen diversas citoquinas y quimioquinas que actúan como mediadores inmunes en cooperación con los producidos por la microglía.

g. Funciones vasculares

Constituyen una de las funciones principales de los astrocitos y se relaciona directamente con la función de soporte metabólico de las neuronas. Las funciones vasculares pueden resumirse principalmente en angiogénesis, inducción y modulación de la barrera hematoencefálica y control del tono vascular. Por una parte, la presencia de astrocitos en cultivo hace que las células endoteliales formen estructuras similares a capilares (Lattera y cols., 1990). Además los astrocitos liberan moléculas que pueden actuar como mitógenos y morfógenos para las células endoteliales (Zhang

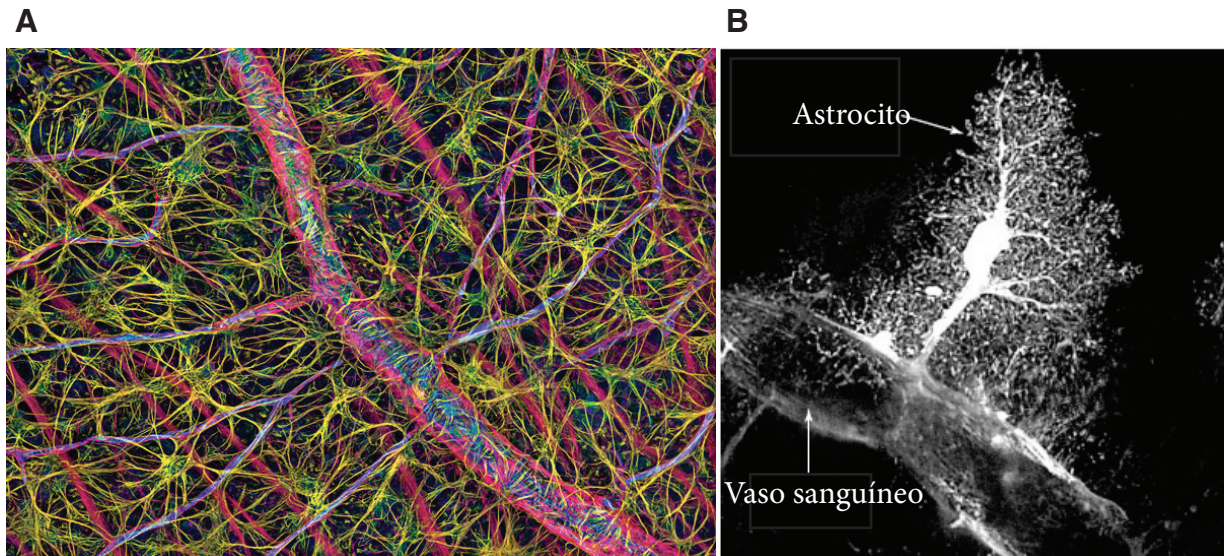


Figura 17. Asociación entre astrocitos y vasos sanguíneos a través de sus procesos y sus pies chupadores. A. Imágen de astrocitos en retina, a donde llegan a través del nervio óptico y ocupan la capa nerviosa (Fuente: Thomas J. Deerinck, University of California). **B.** Astrocito expresando GFP (Modificado de Nedergaard y cols., 2003).

y Harder, 2002). Esta influencia es mutua ya que el endotelio también controla la maduración de los astrocitos (West y cols., 2005; Foo y cols., 2011). Respecto a la barrera hematoencefálica, los astrocitos no contribuyen estructuralmente pero se piensa que regulan su inducción a nivel de formación de uniones tipo tight y expresión de sistemas de transporte (Abbott y cols., 2006). Además liberan algunas moléculas implicadas en el control de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica como ATP, endotelina-1, glutamato, IL-5 y TNF- α , MIP-2 y óxido nítrico, las cuales actúan incrementando la permeabilidad de las uniones tipo tight (Wang y Bordey, 2008). Aún así, también parece existir señalización específica y directa de los astrocitos sobre las células endoteliales (Paemeleire y Leybaert, 2000a). Por otra parte, a nivel del tono vascular se ha visto que la actividad cerebral puede inducir cambios localizados en el flujo sanguíneo en un proceso conocido como hiperemia. Pues bien, diversos experimentos en rodajas de cerebro muestran que los astrocitos participan en ese proceso de acoplamiento neurovascular, lo cual debido a su posición privilegiada entre neuronas y vasos sanguíneos (**Figura 17**), parece muy razonable. Por ejemplo, la estimulación de astrocitos llevó a incrementos del calcio intracelular que se propagan en forma de onda a los pies terminales y producen vasodilatación o vasoconstricción (Zonta y cols., 2003; Mulligan y MacVicar, 2004).

h. Procesamiento de la señal sináptica

El 57 % de sinapsis hipocampales están en contacto directo con astrocitos (Ventura y Harris, 1999), en el cual, lejos de ser un contacto estático, los procesos astrocitarios se retraen y extienden rápidamente. Esta motilidad podría ser fundamental para la regulación de la transmisión sináptica

y extrasináptica (Piet y cols., 2004). En particular los astrocitos controlan el nivel de activación de los receptores presinápticos de glutamato en los terminales glutamatérgicos, regulando la eficacia sináptica en las sinapsis excitatorias (Oliet y cols., 2001b). Además también constituyen una barrera física a la difusión de los neurotransmisores lo cual tiene un efecto drástico en su concentración. Asimismo, unido a su papel en la sinaptogénesis descrito anteriormente, también podrían participar en la estabilización y maduración de sinapsis. Del mismo modo, los astrocitos también participan en la modulación de la eficacia sináptica en sincronía con las neuronas. Cuando éstas se activan, se liberan neurotransmisores en los terminales presinápticos que pueden activar receptores en los astrocitos vecinos llevando a incrementos de calcio que parecen transmitirse a través de ondas de calcio (Kuga y cols., 2011). Estos cambios en los astrocitos producen la liberación de gliotransmisores que pueden influenciar a las neuronas modulando la eficacia sináptica en una escala que va de milisegundos a segundos. Este fenómeno, ampliamente estudiado en los últimos años, alcanza su máximo exponente en el concepto de sinapsis tripartita y en la generación de potenciación a largo plazo, uno de los mecanismos moleculares de aprendizaje y memoria mejor establecidos (Perea y Araque, 2007).

i. Respuesta a lesiones

Como se describió anteriormente (ver Antecedentes históricos de la glía), la respuesta a lesiones constituye otra de las funciones astrocitarias conocidas desde hace más tiempo. Tras diferentes lesiones en el SNC (traumática, isquémica, por estrés oxidativo, etc.) se produce una masiva respuesta astrocitaria. Esta respuesta general, conocida como astrogliosis, desencadena un cambio fenotípico en el astrocito que lo convierte en una forma especializada denominada astrocito reactivo (**Figura 18**). Entre otros cambios, la astrogliosis produce proliferación e hipertrofia astrocitaria (revisado en Hatten y cols., 1991; Norton y cols., 1992), la cual se caracteriza por cambios morfológicos (hipertrofia y extensión de procesos) y alteración de la expresión de múltiples genes (Eddleston y Mucke, 1993; Eng y Ghirnikar, 1994). Todas estas alteraciones persiguen el restablecimiento de la homeostasis del sistema, lo cual como se ha descrito anteriormente también constituye una de las funciones astrocitarias fundamentales en condiciones normales. Este intento de recuperar la homeostasis del sistema, implica que en el caso de lesiones focales aparezca una cicatriz glial que aislará en gran parte el problema a la zona de la lesión. Esta cicatriz glial ha sido relacionada con

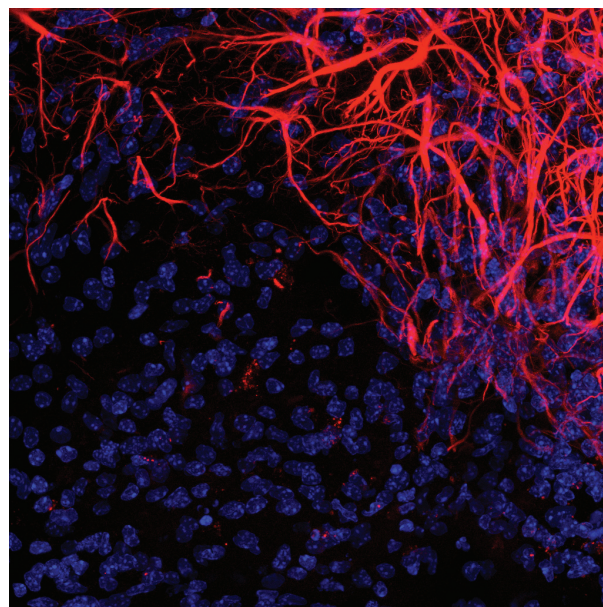


Figura 18. Astrocitos reactivos vistos por inmunomarcaje para GFAP en las inmediaciones de una lesión incisiva en corteza cerebral.

el impedimento en el crecimiento de axones (Ramon y Cajal, 1928; Clemente y Windle, 1954; Reier y cols., 1983; Liuzzi y Lasek, 1987; Rudge y Silver, 1990).

A nivel molecular, la astrogliosis produce una serie de cambios en la expresión génica que conllevan un incremento en la expresión del canal de calcio tipo L, lo cual sugiere un aumento en la capacidad de tamponamiento de calcio y la implicación de una cascada de señalización dependiente de calcio que lleva a la liberación de factores neurotróficos (Vaca y Wendt, 1992; Westenbroek y cols., 1998). Tanto en caso de enfermedad como de lesión, los astrocitos pueden además liberar una descarga de interleuquinas como la interleuquina 6 que podría controlar tanto la respuesta inmune a la lesión como la determinación de los progenitores inmaduros para ser astrocitos (Dong y Benveniste, 2001; Ridet y cols., 1997). Así pues, los astrocitos también liberan neuregulinas (Tokita y cols., 2002), que parecen actuar controlando la proliferación y diferenciación del linaje oligodendrocítico, así como VEGF (Zhang y Chopp, 2002) y FGF-2 (Reilly y Kumari, 1996), los cuales son potentes amplificadores de la proliferación de progenitores y además parecen tener efectos protectores por recaptura de glutamato, secuestro de radicales libres y liberación de neurotrofinas (Sofroniew y cols., 2001; Chen y Swanson, 2003). Sin embargo, esta función astrocitaria puede llegar a tener efectos potencialmente dañinos causados por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias o radicales citotóxicos (Kolker y cols., 2001; Chen y Swanson, 2003), así como inhibiendo el crecimiento axonal.

A pesar de los posibles efectos perjudiciales, la importancia de los astrocitos en las lesiones es clara y se refleja en que el proceso de astrogliosis aparece bastante conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados (Larner y cols., 1995). Además, la ablación de astrocitos reactivos después de daño cerebral moderado causó una degeneración neuronal e inflamación sustancial, con un 60% más de pérdida de tejido (Myer y cols., 2006). Asimismo, en lesión medular la ablación específica de los astrocitos reactivos exacerbó la severidad de la lesión ya que fueron esenciales para la curación de la herida, proporcionando protección a neuronas y oligodendrocitos, lo cual preservó las funciones motoras después de daño medular leve o moderado (Faulkner y cols., 2004).

iii. DESARROLLO ASTROCITARIO Y GLIOGÉNESIS

La gliogénesis es uno de los procesos de desarrollo en el SNC peor conocidos. Los pocos estudios que existen se dispersan entre diversos modelos: distintas regiones (que no tienen por qué sufrir procesos gliogénicos similares), in vitro/in vivo, distintos organismos, etc. Sin embargo resulta imprescindible conocer los procesos gliogénicos en profundidad para poder establecer relaciones de linaje y saber qué células son distintas y no solo diferentes expresiones del mismo tipo de célula en distintos ambientes.

El SNC se diferencia a partir del neuroectodermo, que constituye una especialización del ectodermo. Este neuroectodermo se invagina dando lugar al tubo neural que a su vez sufrirá un proceso de expansión y regionalización rostrocaudal que generará sus futuras subdivisiones. Mientras el SNC está experimentando los procesos de regionalización, células de la cresta

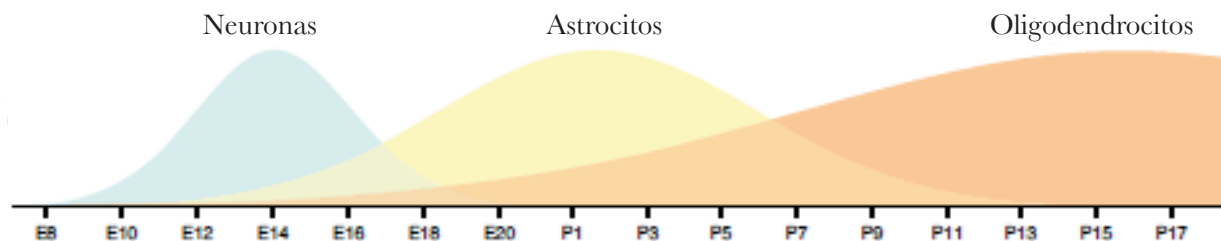


Figura 19. Secuencia temporal de generación de los distintos tipos neurales en el cerebro del ratón (Modificado de Sauvageot y Stiles, 2002).

neural diferenciadas desde el tubo neural en desarrollo habrán migrado a regiones específicas, empezando a formar el SNP. Además, el ectodermo en la región craneofacial se diferencia para formar las placodas que darán lugar a más derivados del SNP y a ciertos tipos celulares del SNC. De este modo, las células de ambos sistemas tienen linajes distintos desde etapas muy tempranas del desarrollo.

Dentro del SNC, la sucesión temporal comienza con la neurogénesis, seguida por la astrogénesis y finalmente la oligodendrogénesis (**Figura 19**). Todos estos fenómenos ocurren a partir de progenitores del neuroectodermo. En paralelo, los derivados no ectodérmicos como la microglía (mesodermo) y los vasos sanguíneos (endodermo) invaden el cerebro en edades tempranas del desarrollo embrionario.

De este modo, todos los astrocitos procederían en última instancia del tubo neural. En el tubo neural existen células multipotenciales conocidas con el nombre de células neuroepiteliales que en principio podrían dar lugar a cualquier tipo celular neuroectodérmico. Si bien estas células podrían diferenciarse directamente a algún tipo celular concreto, producirían además otras células con un potencial cada vez más restringido, especializadas en la producción de un tipo neural u otro (revisado en Rao, 1999). Posteriormente, las células neuroepiteliales se transforman en células de glía radial que podría considerarse el primer tipo glial generado en el SNC, jugando un papel fundamental en la generación de la mayoría de tipos neurales (revisado en Campbell y Götz, 2002; Kriegstein y Götz, 2003). De hecho, las células de glía radial comparten ciertas propiedades con los astrocitos como la presencia de gránulos de glicógeno o la expresión de BLBP, GLAST o GFAP (Malatesta y cols., 2003). Todo este proceso de maduración y en definitiva de pérdida de potencialidad está determinado por cambios en la expresión génica y se define en base a la distinta expresión de marcadores específicos de cada estadio, de su capacidad proliferativa, dependencia de factores de crecimiento y de su potencial para generar tipos celulares.

Como hemos mencionado la restricción en la capacidad de división y diferenciación va produciendo distintos tipos de precursores restringidos. Dentro del linaje astrocitario los tipos de progenitores teóricos que se pueden considerar en función de su potencialidad serían: A) progenitores que pueden producir todos los tipos neurales; B) progenitores que producen glía y al menos otro tipo neural; C) progenitores que solo producen glía; D) progenitores que solo producen astrocitos; y finalmente E) progenitores que producen únicamente subtipos astrocitarios.

En un plano más práctico y centrándonos en los progenitores gliales propuestos de forma

teórica, se han descrito al menos hasta seis tipos distintos (Trotter y Schachner, 1989; Grinspan y cols., 1990; Rao y Mayer-Proschel, 1997; Seidman y cols., 1997; Zhang y cols., 1998; Mi y Barres, 1999). Aunque minoritarios (en torno a un 18 %), los primeros progenitores restringidos para producir glía (subtipo B de nuestra clasificación) aparecen en ratón en E9,5 (McCarthy y cols., 2001). Dentro de estos habría progenitores que generan exclusivamente clones de astrocitos, otros de oligodendrocitos y otros mixtos, con lo cual parece clara la existencia incluso a esta edad de progenitores de tipo D. Estos resultados contrastan con otro estudio que inyectó retrovirus en E13 y no vio clones puros de glía aunque sí en E16 (Costa y cols., 2009). Por otra parte, en rata parece ser que el primer subtipo de progenitor restringido a producir glía se ha aislado alrededor de E13,5 a partir de médula espinal. Este subtipo podría dar lugar en cultivo a oligodendrocitos y astrocitos de tipo I y II (Rao y cols., 1998), siendo distinto, por un lado de las células neuroepiteliales en la expresión del antígeno de A2B5 y por otro de los O2A (descritos posteriormente) en que también daría lugar a los astrocitos de tipo I. Asimismo también les diferencia su inicial falta de expresión de NG2 y receptor tipo A del factor de crecimiento derivado de plaquetas así como su limitada adhesión a laminina y preferencia por fibronectina (Rao y Mayer-Proschel, 1997; Rao, 1999).

El progenitor O2A es uno de los primeros precursores gliales (tipo B) mejor descritos y caracterizados (Noble y cols., 1988). Fueron aislados por primera vez de nervio óptico de rata (Raff y cols., 1983b) y posteriormente también de la corteza cerebelar (Levi y cols., 1987), corteza cerebral (Behar y cols., 1988) y médula espinal (Fok-Seang y Miller, 1994). Estas células, caracterizadas principalmente *in vitro*, expresan el antígeno de A2B5 y PDGFR α y poseen un sinfín de otras propiedades diferenciales (ver Skoff y Knapp, 1995). A pesar de que en cultivo suelen producir oligodendrocitos y astrocitos de tipo 2 (definidos también por la expresión del epítipo A2B5), estudios con trasplantes demostraron que *in vivo* no parece tan claro que contribuyan al linaje astrocitario (Espinosa de los Monteros y cols., 1993; Franklin y cols., 1995; Sawamura y cols., 1995). Esto llevó a llamarles OLP u OPC o células progenitoras de oligodendrocitos. Otro aspecto confuso de los progenitores O2A es que expresan NG2 lo cual hace preguntarse si dichas células son las mismas que se encuentran en adulto. Lo sean o no, lo que es claro es que ambos tipos, las embrionarias y las adultas pueden producir oligodendrocitos. Pero es más, Zhu y cols. (2011) demostró que en embrionario las células NG2 producen clones homogéneos de oligodendrocitos o astrocitos, lo cual sugiere la existencia de subtipos de células NG2. Por esta razón la expresión de NG2 no parece ser un buen marcador de los distintos progenitores.

Respecto a los progenitores exclusivamente astrocitarios, muchos estudios en cultivo han demostrado su existencia. Un ejemplo son los trabajos de Mi y Barres (1999) que mostraron la presencia de un precursor de astrocitos que si bien expresaba el antígeno de A2B5 y Pax2 carecían de expresión de GFAP y de otros marcadores astrocitarios. Bajo condiciones de cultivo apropiadas esta célula se diferencia en astrocitos de tipo I y II pero nunca en oligodendrocitos. Aún así, no queda claro si en otras condiciones de cultivo podrían dar lugar a oligodendrocitos. También Seidman y cols. (1997) describieron en el cerebelo de ratones E16 y aislaron a partir de

una línea glial immortalizada, un precursor restringido a astrocitos que no expresaba GFAP y que fue dependiente de EGF. En condiciones de diferenciación, estas células expresaron altos niveles de GFAP pero no se diferenciaron en oligodendrocitos. De este modo, esta célula que no expresa el antígeno de A2B5, parece producir únicamente astrocitos de tipo I. De forma similar, Fok-Seang y Miller (1992) aislaron de médula espinal neonatal un precursor restringido a producir astrocitos. Este precursor, que también expresaría un epítipo reconocido por el anticuerpo A2B5, fue muy migratorio y proliferó en respuesta a suero y PDGF, pudiendo diferenciarse en astrocitos en cultivo.

Aunque parece claro que en condiciones de cultivo se pueden aislar progenitores específicos de astrocitos, éstos podrían exhibir otra potencialidad en las condiciones microambientales concretas que se dan durante el desarrollo. Sin embargo, también *in vivo* se ha demostrado la existencia de progenitores específicamente astrocitarios. Un ejemplo fueron los trabajos con quimeras de pollo y codorniz, que demostraron que durante cierto periodo del desarrollo embrionario, el dominio dorsal del tubo neural solo contribuye a la gliogénesis produciendo astrocitos, al contrario que los dominios ventrales que producían astrocitos y oligodendrocitos (Pringle y cols., 1998). Esto implica necesariamente la existencia de progenitores determinados, al menos temporalmente, para producir astrocitos. En roedores la inyección de retrovirus durante la gliogénesis demostró que se forman múltiples grupos compuestos exclusivamente por astrocitos (Luskin y cols., 1988; Price y Thurlow, 1988; Grove y cols., 1993; Levison y Goldman, 1993; Luskin y cols., 1993; Luskin y McDermott, 1994; Parnavelas, 1999; Zerlin y cols. 2004). Esto indudablemente también implica la existencia de progenitores que al menos en las condiciones que se dan *in vivo* están restringidos a producir astrocitos. Asimismo, en concordancia con la proposición de Miller y Raff (1984) en la que sugieren que los astrocitos protoplásmicos y fibrosos son distintos desde el punto de vista del desarrollo (debido a que son generados en distinto estadio), Grove y cols. (1993) mostraron la posible existencia de clones únicamente formados por astrocitos fibrosos, lo cual de ser confirmado, demostraría la existencia de progenitores de subtipos de astrocitos. No obstante, aunque la existencia de progenitores restringidos a astrocitos o incluso a subtipos de astrocitos parece indudable, futuros estudios requieren una caracterización mucho más fina de estos progenitores, aportando posibles marcadores moleculares.

La mayoría de progenitores mencionados hasta ahora se aislaron o describieron en tejido embrionario. Sin embargo existe un gran aporte postnatal de astrocitos desde las capas proliferativas, el cual unido a las últimas divisiones celulares y a la diferenciación final de los astrocitos que ocurre en las capas de destino durante este estadio, hacen que la producción de astrocitos se produzca principalmente durante la primera semana postnatal. El aporte postnatal de astrocitos y progenitores astrocitarios a las capas de destino ocurre de dos formas. Por una parte, la SVZ genera astrocitos que colonizan la corteza cerebral, la sustancia blanca y el estriado a través de una migración que sigue los procesos de glía radial y que constituye un remanente de los procesos gliogénicos embrionarios (Marshall y cols., 2003). Pero además y en sincronía con el cese de la neurogénesis cortical, la glía radial inicia un proceso de transformación en

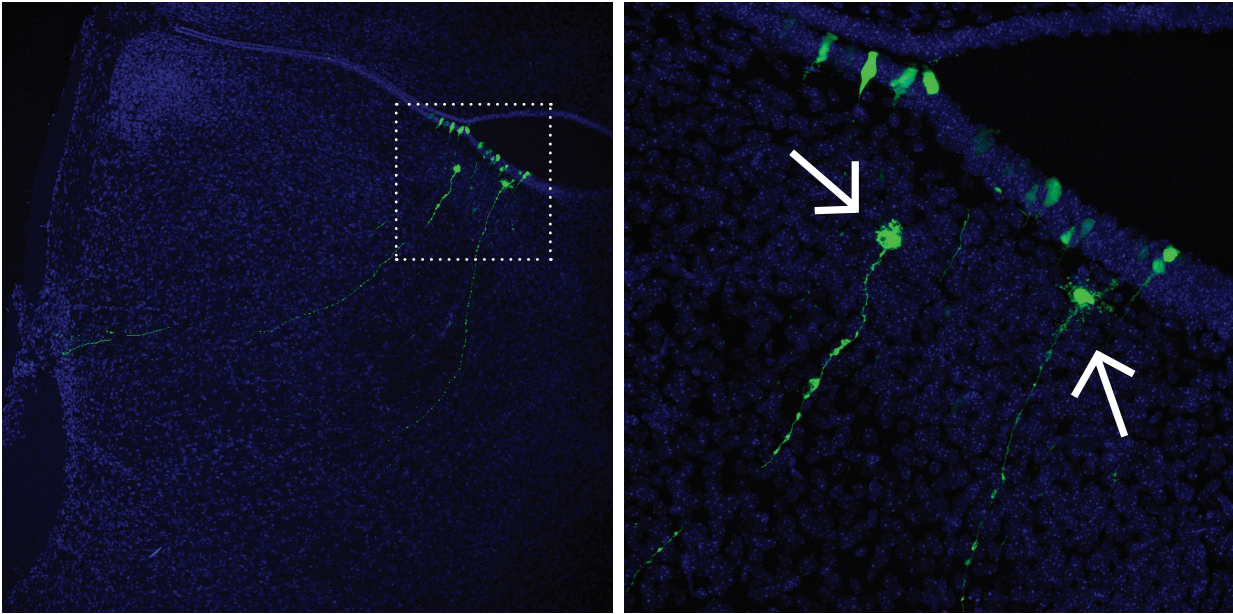


Figura 20. Transformación de la glía radial en astrocitos en el tercer ventrículo. Las flechas indican células de glía radial que ya se han despegado de la capa ventricular.

astrocitos que contribuye enormemente a las poblaciones astrocitarias (Schmechel and Rakic, 1979; Voigt, 1989; Cameron and Rakic, 1991). En este proceso, la glía radial pierde inicialmente su agarre ventricular, de modo que su cuerpo celular se mueve radialmente alejándose de la región germinativa hacia la capa del manto, región donde se libera de sus agarres piales y se diferencia morfológica y bioquímicamente en astrocitos (**Figura 20**). Esto implica la existencia de al menos dos orígenes para todos los astrocitos del cerebro. Por un lado, a través de astrocitos que proceden de las células ventriculares y/o por extensión de las subventriculares (por división) y por otro, a través de la transformación de glía radial (zona ventricular) que ocurre durante la etapa postnatal. Estos caminos distintos de generación astrocitaria sugieren que los astrocitos poseen características diferenciales en función de su origen. Además, mientras el origen a través de glía radial parece mostrar pocos interrogantes en cuanto al árbol genealógico, la generación de astrocitos a través de precursores intermedios constituye una compleja red de relaciones de linaje de la cual queda mucho por conocer.

F. HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA

La visión más clásica de los astrocitos como elemento de soporte estructural ha llevado asociado otro concepto erróneamente incompleto: los astrocitos representan una población homogénea de células. Sin embargo, a la vista del sinfín de funciones atribuidas a estas células, parece difícil imaginarse cómo una población homogénea de células podría dar lugar a tal diversidad de funciones en la fisiología cerebral. De hecho, el estudio más profundo de los astrocitos revela la imponente heterogeneidad de sus poblaciones, lo cual rompe con el dogma anterior.

La primera descripción de heterogeneidad astrocitaria surge con la clasificación dicotómica en

astrocitos protoplásmicos y fibrosos, basada únicamente en criterios morfológicos. Esta descripción ha sido completada ampliamente considerando otros criterios bioquímicos y funcionales. Por ejemplo, se ha visto que los astrocitos presentes en tractos de sustancia blanca como el cuerpo callosum, expresan mayores niveles de GFAP que los astrocitos de sustancia gris como corteza cerebral o estriado donde la expresión de GFAP es esporádica y comparativamente menor (Bachoo y cols., 2004; Lein y cols., 2007). Algo similar ocurre para la proteína asociada con metástasis tipo 1 o S100A4 (Kozlova y Lukanidin, 1999; Aberg y Kozlova, 2000) o para una nueva variante de splicing del transportador de aminoácidos excitatorios tipo 2 (EAAT2/GLT1; Macnab y Pow, 2007), ambas expresadas por astrocitos de sustancia blanca pero no por aquellos de sustancia gris. Lo contrario ocurre con la conexina 30, la cual se expresa únicamente en astrocitos de la sustancia gris pero no en aquellos de la sustancia blanca (Nagy y cols., 1999). Asimismo, ambos tipos también difieren en la propagación de ondas de calcio o en la extensión del acoplamiento intercelular demostrado por inyecciones de biocitina, el cual es mucho mayor en sustancia gris que en astrocitos de sustancia blanca (Haas y cols., 2006). Esto determina sin duda que las ondas de calcio se propaguen de forma distinta en sustancia gris y blanca. Mientras que en la corteza la propagación requiere uniones tipo GAP funcionales (Haas y cols., 2006), en el cuerpo calloso las ondas de calcio siguen propagándose por un mecanismo dependiente de la liberación de ATP, incluso en condiciones en las que se bloquea el acoplamiento con inhibidores específicos (Schipke y cols., 2001). Del mismo modo, también difieren respecto a los mecanismos implicados en su desarrollo, ya que se ha demostrado que la producción de astrocitos fibrosos requiere Olig2, cosa que no ocurre con los astrocitos de sustancia gris (Cai y cols., 2007). Como se ha descrito anteriormente, esto podría reflejar su origen distinto a partir de progenitores especializados en cada subtipo.

De forma similar y generalizando un poco más, la heterogeneidad astrocitaria contempla dos niveles distintos en función de su dimensión espacial.

i. Heterogeneidad regional

Es aquella que ocurre entre astrocitos de regiones cerebrales distintas. Debido a que las distintas regiones suelen derivar de regiones neuroectodérmicas también diferentes y a que además suelen estar sometidas a patrones de microambiente distintos, es habitual que la heterogeneidad regional refleje las mayores diferencias astrocitarias. Estas diferencias regionales se manifiestan en al menos tres parámetros: morfológicos, moleculares y funcionales. Un ejemplo de los parámetros moleculares es la mayor expresión de GFAP en astrocitos de hipocampo y glía de Bergmann del cerebelo en comparación con astrocitos de corteza cerebral e hipocampo (Wilhelmsson y cols., 2006; Lein y cols., 2007). Esto sin duda tiene relación con la distinta regulación génica de dicha expresión de GFAP, la cual también es distinta para distintas regiones del SNC (Lee y cols., 2006). Otros ejemplos que desembocan directamente en la funcionalidad astrocitaria son la expresión de EAAT2, mayor en la formación hipocampal que en cerebelo y de EAAT1, la cual tiene un patrón inverso (Lehre y cols., 1995). También en este sentido, la expresión de Cx30 es alta en el globo

pálido pero no se detecta en el estriado, lo cual indica que astrocitos en núcleos GABAérgicos adyacentes de los ganglios basales muestran también heterogeneidad molecular (Nagy y cols., 1999). Otros ejemplos de diferencias moleculares, con repercusión directa en la funcionalidad, son la expresión de receptores NMDA en astrocitos corticales y no en los hipocámpales (Seifert y Steinhäuser, 1995), receptores de glicina en astrocitos de médula espinal (Pastor y cols., 1995) pero no en células de Bergmann (Huang y cols., 2004) o la baja expresión del transportador Glt-1 en astrocitos de médula espinal en comparación con los del resto del cerebro (Regan y cols., 2007). Además, en una visión general de los perfiles de expresión génica, Doyle y cols. (2008) demostraron mediante purificación de mRNA en proceso de traducción (técnica conocida como Translating Ribosome Affinity Purification o TRAP), grandes diferencias entre astrocitos corticales, cerebelares y glia de Bergmann, algo similar a lo que ocurre en astrocitos en cultivo (Yeh y cols., 2009).

Respecto a los criterios morfológicos, Emsley y Macklis (2006) dividieron a los astrocitos en 9 subtipos distintos, a la vez que observaron que la densidad de astrocitos puede variar por un factor de 1000, siendo muy baja en el centro del núcleo acumbens o muy alta en la SVZ.

Desde una perspectiva funcional, también se han demostrado diferencias entre astrocitos de distintas regiones, como por ejemplo en sus perfiles de corriente (Guatteo y cols., 1996). Un ejemplo es la existencia de una gran población de astrocitos en el núcleo supraóptico del hipotálamo de rata, la cual no muestra una corriente de entrada de glutamato, al contrario de lo que suele suceder con astrocitos de otras regiones cerebrales. Además esta subpoblación, que exhibe morfología de glía radial, no se encuentra acoplada, al menos según se demuestra por la inyección de colorantes (Israel y cols., 2003). Otro ejemplo a otro nivel de funcionalidad lo constituye la distinta capacidad de estimular crecimiento neurítico y ramificación, que ocurre entre astrocitos de distintas regiones (Denis-Donini y cols., 1984; Garcia-Abreu y cols., 1995).

ii. Heterogeneidad local

Poblaciones astrocitarias dentro de la misma región cerebral muestran también importantes diferencias en distintos parámetros de comparación. Un gran ejemplo de esta heterogeneidad local lo constituye la capa IV de la corteza somatosensorial primaria, donde las neuronas que reciben la información sensorial de las vibrisas se agrupan en unidades anatómicas discretas denominadas “barriles”. En estos barriles, que forman un mapa somatotópico que refleja la posición de cada vibrisa, el acoplamiento sináptico está favorecido entre neuronas excitatorias dentro de cada barril individual, mientras que existe una baja conectividad entre neuronas de barriles vecinos. Pues bien, esto está correlacionado con el hecho de que el acoplamiento por uniones tipo GAP de los astrocitos es similar y se restringe a barriles individuales donde la expresión de Cx43 y Cx30 es mayor que en la región entre barriles o en otras áreas de la corteza (Houades y cols., 2008), algo que también ocurre de forma similar en los glomérulos del bulbo olfativo (Roux y cols., 2011). Por otra parte, este acoplamiento también es distinto entre las distintas capas corticales.

Mientras en las capas 1 y 2/3 de la corteza las redes de acoplamiento fueron elongadas en la dirección paralela a la superficie de la corteza, en las capas 4 y 5 las redes fueron circulares. Esta heterogeneidad en el acoplamiento entre astrocitos también fue descrita en el hipocampo, donde las células se acoplan en redes con forma circular a nivel del estrato radiado, al contrario de lo que sucede con los astrocitos hipocámpales cercanos a las células piramidales, los cuales forman redes elongadas en la dirección paralela a la capa de células piramidales (Houades y cols., 2006). Así pues, el acoplamiento por uniones tipo GAP es además más extenso en la región CA1 que en la CA3 del hipocampo (D'Ambrosio y cols., 1998). Por otra parte, y relacionado muy posiblemente con el acoplamiento entre células, las oscilaciones de Ca^{2+} en la capa 2/3 están muy sincronizadas entre distintos astrocitos, mientras que en capa 1 son asíncronas con una frecuencia dos veces mayor (Takata y Hirase, 2008).

A pesar de que en un principio se describieran dos tipos de astrocitos en base a sus perfiles de corriente y finalmente parece tratarse de dos tipos de células distintas (astrocitos y células NG2), existen otras diferencias electrofisiológicas entre astrocitos de la misma región. Por ejemplo en la médula espinal, las corrientes de entrada de K^+ son menores en el cuerno dorsal respecto al ventral, lo cual está relacionado con la mayor expresión del canal Kir4.1 en el cuerno ventral respecto al dorsal (Olsen y cols., 2007).

Por último también existen diferencias locales a nivel morfológico. Uno de los mejores ejemplos es el BO donde han sido descritos hasta cinco subtipos diferentes en base a su morfología (**Figura 21**; Bailey y Shipley, 1993; Chiu y Greer, 1996). Este fenómeno es tan local que se han llegado a describir varios de estos subtipos incluso en la misma capa, expuestos a idénticos microambientes.

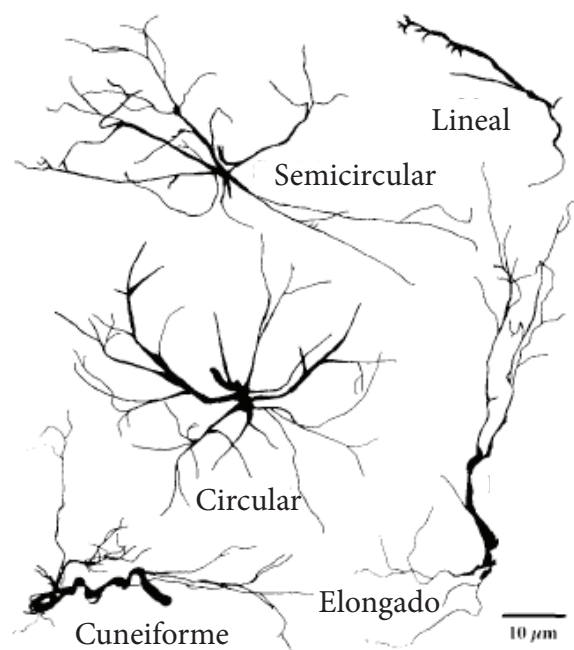


Figura 21. Dibujos a cámara lúcida de las distintas morfologías astrocitarias encontradas en el Bulbo Olfativo mediante un inmunomarcaje para GFAP (Modificado de Chiu y Greer, 1996).

II. PAPEL DE LA ASTROGLÍA EN LA NEUROGÉNESIS DE INTERNEURONAS DE BULBO OLFATIVO

A. NEUROGÉNESIS DE INTERNEURONAS DE BO COMO MODELO DE DESARROLLO

Uno de los aspectos que parecen determinantes para la plasticidad del sistema olfativo es la capacidad que tiene para la reorganización de sus circuitos y el recambio de sus elementos. Esta

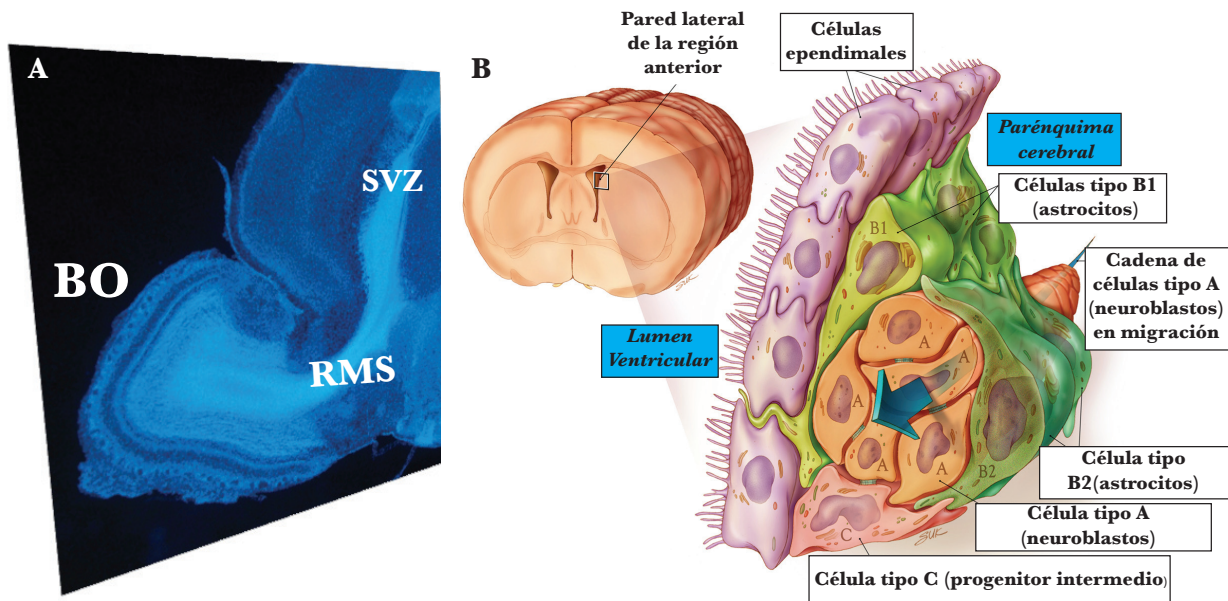


Figura 22. Neurogénesis de interneuronas de BO. A. Corte sagital teñido con un marcador nuclear. B. Dibujo ilustrando los distintos tipos celulares que se localizan en la SVZ en relación al proceso neurogénico (Cortesía del Prof. García-Verdugo).

capacidad se ve reflejada en que sufre dos procesos de neurogénesis adulta: neurogénesis de las OSN y neurogénesis de interneuronas del BO. Por el gran número de neuronas producidas y por la tremenda distancia que deben recorrer los neuroblastos desde el origen a su destino, la neurogénesis de interneuronas del BO es un modelo único de desarrollo en la etapa adulta.

La neurogénesis de interneuronas de BO comienza en la SVZ de los ventrículos laterales, donde se encuentran progenitores neuronales de naturaleza astrogliar o células B (**Figura 22**; Garcia y cols., 2004). Estos progenitores, que representan otro ejemplo de heterogeneidad astrogliar, tienen unas propiedades muy características, a caballo entre el fenotipo de glía radial y el astrocitario (Liu y cols., 2006). Estas características también se manifiestan en la capacidad de producir células intermediarias de división rápida o células C, que son las que finalmente producen los neuroblastos migratorios. Estos neuroblastos migran en cadena y se agrupan en la RMS, un camino migratorio muy restringido y que está compuesto por los neuroblastos experimentando migración tangencial y los procesos y células astrocitarias que delinean las cadenas de neuroblastos y el camino migratorio (Doetsch y cols., 1997; Jankovski y Sotelo, 1996; Peretto y cols., 1997; Thomas y cols., 1996). Atravesando el parénquima cerebral, la RMS cursa una distancia de varios milímetros hasta alcanzar el BO, en donde las cadenas migratorias se deshacen y los neuroblastos alcanzan las capas glomerular y granular mediante un proceso de migración radial individual. En estas capas se diferenciarán a neuronas periglomerulares y granulares respectivamente que tendrán que integrarse en circuitos ya establecidos completando la finalidad de este sistema.

Uno de los hechos más enigmáticos sobre este fenómeno es su posible implicación en la recuperación de lesiones ya que dicho tráfico celular parece desviarse a regiones de corteza y estriado que hayan sufrido una lesión, aunque no desemboquen en una neurogénesis muy significativa en las regiones lesionadas. (Sundholm-Peter y cols., 2005; Faiz y cols., 2008).

B. FACTORES IMPLICADOS EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS EN LA RMS: PAPEL DE LA MATRIZ ASTROGLIAL

El proceso migratorio que conduce a los progenitores neuronales desde la SVZ hasta el BO ha suscitado un gran interés para muchos autores. Uno de los puntos más interesantes es el conocimiento de los factores que permiten que estas células migren a través de un cerebro adulto en el cual el resto de procesos migratorios han finalizado y que a priori no parece muy permisivo para la migración. Este interés ha llevado a la aparición de un gran número de trabajos analizando los factores moleculares mediando esta migración celular. Sin embargo, algunas cuestiones como el origen celular de estos factores moleculares sigue siendo un misterio.

La división en dos fases, tangencial y radial del fenómeno migratorio se ha visto reflejado también en una separación de las funciones de los factores moleculares estudiados. Así pues, pocos de ellos están implicados en ambas fases. Relativo a la fase tangencial de la migración, se ha demostrado que factores como PSA-NCAM (Hu y cols., 1996), slit-2 (Nguyen-Ba-Charvet y cols., 2004), efrinas (Conover y cols., 2000), integrinas (Belvindrah y cols., 2007; Emsley y Hagg, 2003) o metaloproteasas (Bovetti y cols., 2007a) afectan a la motricidad o direccionalidad de esta migración. Del mismo modo, parece que existe también una implicación de las uniones tipo GAP entre células ya que estudios in vitro utilizando agentes desacopladores redujeron considerablemente esta migración (Marins y cols., 2009). Respecto a la fase de migración radial, factores como la prokinetina-2 (Ng y cols., 2005) o la reelina (Hack y cols., 2002) juegan un papel fundamental en atraer a los neuroblastos hacia las capas del OB y producir la ruptura de las cadenas migratorias.

A nivel celular, otro mecanismo muy relacionado con la migración de los neuroblastos ha sido la configuración de los vasos sanguíneos, tanto en la RMS (Snappyan y cols. 2009; Whitman y cols. 2009) y en el BO (Bovetti y cols., 2007b) como en la migración hacia corteza que ocurre mínimamente en las primeras etapas postnatales (Le Magueresse y cols., 2011). En estos casos los vasos sanguíneos actuarían, debido a su disposición paralela al eje migratorio, como andamios o railes a los que las células se asocian íntimamente para migrar.

A pesar de la relación entre los neuroblastos y los tubos de astroglia a lo largo de casi todo el camino migratorio, el papel de los astrocitos sigue siendo controvertido. Así pues, mientras que los astrocitos maduros no están presentes durante el pico de neurogénesis que ocurre en la primera semana postnatal (Law y cols., 1999), lo cual podría indicar que no son muy necesarios para la migración, la glía radial podría sustituirlos en esta función hasta que aparecieran posteriormente ya que al fin y al cabo acabarán transformándose en astrocitos (Alves y cols., 2002). Por otra parte, aunque las células astrogliales parecen no ser imprescindibles in vitro para la migración en cadena (Wichterle y cols., 1997), se ha demostrado que sí que liberan una sustancia soluble que potencia la migración (Mason y cols. 2001). Del mismo modo, se ha descrito la existencia de una comunicación bidireccional entre astrocitos y neuroblastos en la que están implicados los niveles de glutamato y GABA, ambos de los cuales pueden modular el comportamiento migratorio en la

SVZ (Bolteus and Bordey, 2004; Platel y cols., 2008). Asimismo, se ha descrito que los astrocitos parecen tener una función promoviendo el crecimiento de vasos sanguíneos, que como se ha descrito anteriormente, son fundamentales para esta migración (Bozoyan y cols., 2012).

Sin embargo, la participación de los astrocitos en este fenómeno migratorio resulta más desconocida en relación al papel que podrían jugar en la restricción del camino migratorio. La presencia de células que se detienen en el límite entre la SVZ y la sustancia blanca y que retornan de nuevo a la SVZ sugiere la presencia de fronteras entre áreas permisivas y no permisivas (Suzuki and Goldman, 2003). En este punto, la expresión de moléculas de matriz extracelular podría impedir la migración de neuroblastos a zonas adyacentes. Debido a que los astrocitos se encuentran en un lugar clave delineando el camino migratorio, se ha sugerido que podrían formar una barrera física para impedir la dispersión de las células migratorias (Alves y cols., 2002; Jankovski and Sotelo, 1996; Peretto y cols., 1997). Además, la íntima relación entre neuroblastos y vasos sanguíneos, dónde como hemos visto existe una alta densidad de procesos astrocitarios envolviéndolos, podría estar revelando la gran importancia de los astrocitos para el proceso migratorio.

Paradójicamente, tal íntima relación de los astrocitos con la migración podría llegar a impedirla, para lo cual los neuroblastos en su migración disponen de mecanismos que implican la interacción de slit y robo, que actuarían repeliendo los procesos astrogliales y manteniendo el camino libre a la migración (Kaneko y cols., 2010).

III. MÉTODOS DE ESTUDIO DEL LINAJE CELULAR

A. INTRODUCCIÓN A LOS LINAJES CELULARES

Curiosamente fue Rudolf Virchow, el padre de la neuroglia, a quien se le atribuye uno de los postulados de la Teoría Celular con más implicaciones para este y otros trabajos en desarrollo: *omnis cellula e cellula* (todas las células derivan de otra célula). Este simple y ahora evidente concepto desemboca en que se puede trazar una línea que una las distintas células que comparten algún antecesor común. Como si de un árbol genealógico se tratase, esta línea o linaje comienza en el cigoto y se ramifica hasta relacionar todas las células del organismo. En este contexto de desarrollo, los linajes celulares pueden ser invariantes o variantes. Los linajes invariantes son aquellos en los que cada célula da lugar a las mismas células que se rodean por las mismas células vecinas en individuos distintos. Esta correlación entre el linaje celular y el destino celular se asume que es producida porque los destinos celulares están determinados únicamente por factores presentes en la célula en división. De hecho, a menudo la diferenciación en las distintas células se debe exclusivamente a divisiones asimétricas en las que las células hijas heredan de forma desigual los determinantes fenotípicos, como ocurre en *Ciona* (Ascidiacea; Nishida, 1987) y no a

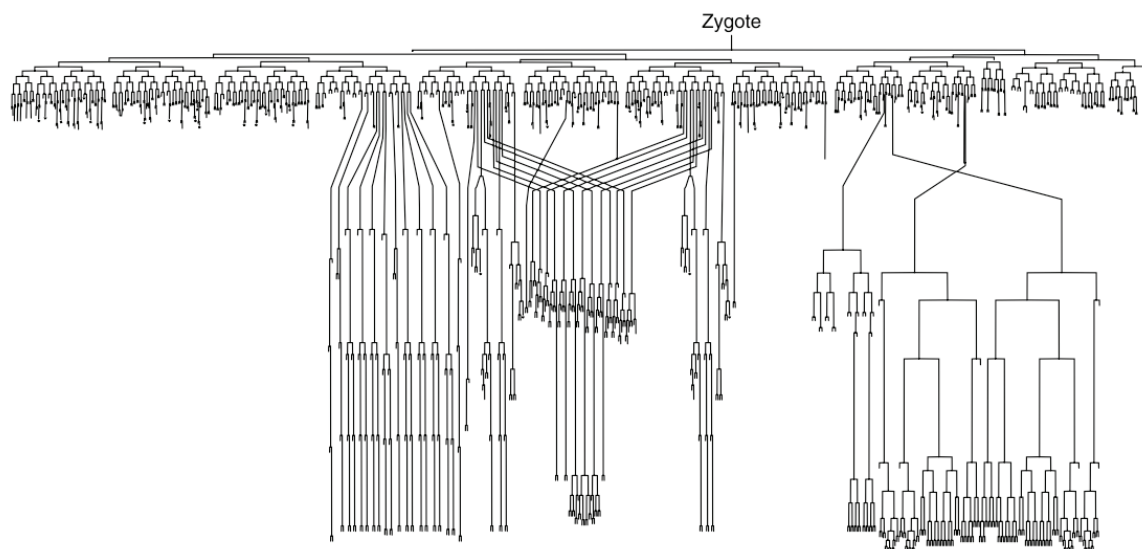


Figura 23. Linaje completo de C. Elegans (Extraído de Salipante y Horwitz, 2007).

factores del microambiente. Un ejemplo de esto es *C. Elegans*, cuyo linaje ha sido descrito en su totalidad (**Figura 23**; Sulston y cols., 1983). En oposición a esto, los linajes variantes (**Figura 24**) son aquellos en los que cada célula no da lugar a las mismas células en distintos individuos, como ocurre en el desarrollo del ratón, donde ya cada blastocisto retiene cierta plasticidad (Cockburn y Rossant, 2010). Esto hace que el linaje no sea absolutamente reproducible en todos los individuos, aunque sí en ciertos rasgos generales, lo cual se debe a que intervienen ciertos factores del microambiente como señales producidas por otras células.



Figura 24. Linajes Variantes. Dos vacas clonadas mostrando diferencias en la pigmentación y el patrón de vaso sanguíneos entre otros rasgos (Extraído de Salipante y Horwitz, 2007).

B. MÉTODOS DE ANÁLISIS CLONAL DE LINAJES CELULARES

Se podría decir que los estudios de linaje celular comienzan alrededor de 1890 con las primeras descripciones de Whitman (1887) sobre los patrones de división en el desarrollo de la sanguijuela, continuando después con otras descripciones de linajes en muchos invertebrados incluyendo nematodos, erizo de mar y ascidias. En todos los estudios de este tipo, la base de cualquier análisis clonal es el estudio de clones derivados de células individualizadas. Esto proporciona una información esencial sobre las características celulares y permite el seguimiento de linajes de células embrionarias, pudiendo suministrar información sobre la tasa y modo de proliferación, dispersión y movimientos celulares y cómo todos ellos trabajan para ensamblar estructuras o compartimentos en el tejido. Los métodos de análisis clonal se pueden clasificar en prospectivos y

retrospectivos en función del conocimiento previo del modelo por parte del investigador.

i. Métodos prospectivos

Se basan en una idea preconcebida del investigador sobre la población progenitora. En este tipo de métodos, la célula o células marcadas son elegidas de algún modo por el investigador y por tanto su posición es conocida. Estas células pueden ser marcadas por inyecciones intracelulares de una enzima (como la peroxidasa de rábano), un marcador (típicamente fluorescente como por ejemplo dextrano conjugados fluorescentes) o DNA codificando un gen reportero (GFP, LacZ). Dentro de esta categoría también pueden incluirse los métodos basados en recombinación homóloga, como el uso de la recombinasa Cre o la flipasa, en los cuales estas enzimas, reguladas bajo un promotor específico, desencadenan la expresión de un gen reportero en todo el linaje de la célula que comenzó expresando la recombinasa. Estas aproximaciones, ampliamente extendidas en multitud de trabajos, también aceptan modificaciones para inducir la expresión de las enzimas en un momento concreto como la activación por choque térmico de FLP (Harrison y Perrimon, 1993) o la versión de CRE inducible por tamoxifeno (Feil y cols., 1997). Cuando la expresión se desencadena en todo tipo de células mediante el uso de promotores ubicuos este método no podría clasificarse como prospectivo ya que apenas se podría saber nada previamente sobre la naturaleza de los progenitores.

Otro de los métodos prospectivos basados en la recombinación homóloga es el análisis de mosaicos con dobles marcadores (MADM) (Zong y cols., 2005). Con este método se produce recombinación mediada por Cre entre cromosomas homólogos conteniendo cada uno secuencias parciales para GFP y RFP. Tras el fenómeno de recombinación homóloga mediado por CRE se reconstituye la secuencia completa de GFP y RFP lo que tras la segregación de las cromátidas tras la mitosis resultará en un mosaico de células verdes, rojas o amarillas cuya marca es compartida por el clon generado a partir del fenómeno de recombinación. Este sistema también se ha implementado en *Drosophila* con el nombre de twin-spot (Griffin y cols., 2009).

Basado también en recombinación homóloga por la CRE recombinasa, se desarrolló el método *Brainbow*, que utiliza el concepto de la producción de marcas específicas en función de la expresión combinatorial de varias proteínas fluorescentes (Livet y cols., 2007). Los autores de este sistema generaron ratones con múltiples copias de un constructo conteniendo múltiples secuencias para tres o cuatro fluoróforos distintos flanqueados por distintos tipos de sitios específicos (Lox) y excluyentes para la CRE recombinasa. Además, uno de los fluoróforos llevaba una señal para su localización nuclear aunque en la práctica apenas consiguieron que funcionase in vivo. Cada evento recombinatorio hace que en la copia de cada transgen se eliminen todos los fluoróforos menos uno. La repetición de este proceso en las N copias del transgen hace que cada célula exprese un número concreto de copias de cada fluoróforo, lo cual genera numerosas tonalidades espectaculares. Sin embargo éste no se aplicó en un principio para el estudio de linajes a pesar de su gran potencial (Livet y cols., 2007). Conscientes de la aplicabilidad de este método al análisis

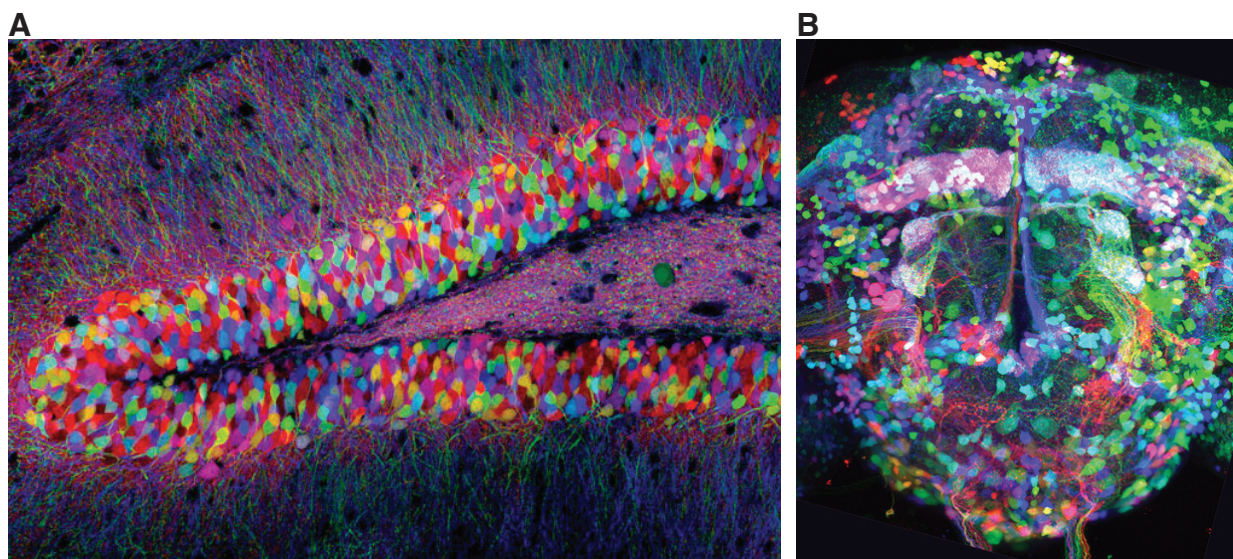


Figura 25. Métodos de análisis clonal basados en la combinación de proteínas fluorescentes.

A. Imagen del hipocampo de un ratón Brainbow. En un principio, el método Brainbow no se utilizó para analizar linajes celulares (Fuente: Dr. Tamir Weissman, Harvard University). **B.** Aplicación de *Brainbow* a *Drosophila*, en la que ya sí se utilizó expresamente para trazado de linajes. En ambas imágenes se puede observar la dificultad de distinguir los múltiples colores debido a que no son suficientes para el elevado número de células (Fuente: Phuong Chung, Stefanie Hampel y Julie H. Simpson, HHMI).

clonal, varios laboratorios desarrollaron nuevas versiones en ratón (*Confetti*; Snippert y cols., 2010) y *Drosophila* (*d-Brainbow*: Hampel y cols., 2011; *Flybow*: Hadjiconomou y cols., 2011), todas basadas en la recombinación mediante recombinasas inducibles. Sin embargo todos estos métodos tienen el problema de la ingente cantidad de células y el limitado número de colores que en la práctica se pueden resolver (**Figura 25**).

Otro de los métodos prospectivos más utilizados, consiste en el trasplante de células marcadas o diferenciadas por algún rasgo, lo cual permite seguir a qué células dan lugar. Como ejemplos famosos de este tipo de experimentos destacan los trabajos de Mangold y Spemann en anfibios (Spemann y Mangold, 1924) y los análisis en quimeras de pollo y codorniz (Le Douarin y Barq, 1969).

Más recientemente, la aparición de proteínas fluorescentes fotomodulables ha permitido marcar células y seguir su progenie (Piatkevich y cols., 2010). Estas proteínas pueden ser activadas o fotoconvertidas tras exposición a un láser con una longitud de onda determinada. Esto ha sido especialmente útil en pez cebra debido a su accesibilidad y transparencia, lo cual ha llevado a la conclusión de que la especificación y función de diferentes clases de ganglios sensoriales trigeminales depende del momento de neurogénesis (Caron y cols., 2008).

Los métodos prospectivos han sido utilizados para establecer mapas de destino de muchos embriones y territorios embrionarios de invertebrados y vertebrados tales como ratón, anfibios y pez cebra. De hecho han resultado fundamentales para describir los linajes completos de varios invertebrados tales como ascidias (*Ciona intestinalis*), erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*),

nemátodos (*Caenorhabditis elegans*) y sanguijuelas (*Helobdella triserialis*). Sin embargo, las principales limitaciones de este tipo de métodos son la restricción a pocas divisiones celulares cuando se usan marcadores no permanentes, las perturbaciones inducidas en el desarrollo por la inevitable manipulación de los embriones (sobre todo en mamíferos) y el sesgo introducido por la elección de las células por el investigador. Además en muchos de los casos descritos, especialmente en los que se utiliza un marcaje genético, el resultado final es un mosaico en el cual el número de células marcadas desborda la capacidad de resolver linajes específicos. Esto lleva en múltiples ocasiones a limitar su interpretación a eventos locales que generan grupos de células que por tanto sí pueden considerarse como unidades clonales.

ii. Métodos retrospectivos

Se basan en estudiar el punto final del experimento e intentar deducir cómo se ha generado el patrón final. Para ello se suele marcar una única célula aleatoria y entonces observar el clon derivado. La información concerniente al destino de la célula marcada y el comportamiento de sus descendientes son deducidos retrospectivamente.

Uno de los trabajos pioneros a este respecto utilizó la recombinación inducida por irradiación con rayos X en *Drosophila* para marcar clones celulares (Becker, 1957). También en plantas se hicieron experimentos de variegación genética, manipulando el silenciamiento génico mediado por un transposón (Vincent y cols., 1995). Como se descrito anteriormente, también puede emplearse como prospectivo el uso de sistemas basados en recombinación inducible, pero ahora utilizando un promotor ubicuo. En este caso se puede ajustar la dosis de inducción (bien por agentes químicos, temperatura, etc.) para obtener menores frecuencias de marcaje y poder obtener conclusiones clonales (Legué y Nicolas, 2005).

Sin lugar a dudas, el método retrospectivo más utilizado en el marcaje de linajes en cerebro de roedores ha sido la infección con retrovirus defectivos para la replicación (Luskin y cols., 1988; Price y Thurlow, 1988; Grove y cols., 1993; Levison y Goldman, 1993; Luskin y cols., 1993; Luskin y McDermott, 1994; Parnavelas, 1999; Zerlin y cols., 2004). Tras el proceso infectivo el virus desencadena la integración de una copia de una secuencia para un gen reportero en forma de provirus. Este método, que fue descrito por primera vez en ratón (Sanes y cols., 1986), permite establecer condiciones de clonalidad cuando se reduce mucho la cantidad de virus presente en cada inyección, de modo que se marque únicamente una célula progenitora. Esto permite seguir su progenie que corresponderá a las células marcadas. Posteriormente este método fue refinado para el análisis clonal mediante el desarrollo de librerías de retrovirus en los que cada virus, además de llevar la secuencia para el gen reportero, también llevaban una pequeña secuencia específica amplificable por PCR (Golden y cols., 1995). Debido a la complejidad de la librería y a la poca probabilidad de que dos células adquieran la misma secuencia específica en eventos de infección independientes, la secuenciación de dicha marca amplificable permite la evaluación de la clonalidad entre las células marcadas. De forma similar aunque menos precisa, otros autores han

intentado mejorar este sistema mediante la utilización de varios genes reporteros, lo cual mejora la resolución clonal (Costa y cols., 2009). Sin embargo, este método tiene algunos problemas relacionados con la imposibilidad de asegurar cuántas células progenitoras se han marcado aunque se usen infecciones mínimas. Estos problemas son de dos tipos: a) Errores de escisión del clon: se produce cuando dos clones distintos no proceden de progenitores distintos sino del mismo cuya progenie se ha dividido en dos grupos distintos; b) Errores de agrupamiento incorrecto: suceden cuando la progenie de dos progenitores convergen en el mismo grupo de células. A pesar de estos errores debieran corregirse con el planteamiento de las secuencias amplificables, la laboriosidad de tal estudio y las numerosas amplificaciones fallidas que suelen ocurrir (Zerlin y cols., 2004), hacen bastante limitada esta aproximación. Además también existen otros problemas como que solo infectan células proliferativas o que son silenciados por mecanismos epigenéticos (Costa y cols., 2009).

Otro de los métodos retrospectivos que se han descrito es el conocido como marcaje LaacZ. Este sistema se basa en la introducción de un gen reportero nLaacZ, que consiste en la secuencia codificante pero no funcional de la β -Galactosidasa, que se consigue al introducir un codón STOP en mitad de la secuencia. Un raro y aleatorio evento de recombinación intragénica desencadenará la producción de un reportero funcional nLacZ que será transmitido a todas las células derivadas del progenitor en el que se produjo tal evento. El resultado son células clonalmente relacionadas que son detectables por la reacción de la β -Galactosidasa/X-Gal (Bonnerot y Nicolas, 1993). Una variación de este método utiliza la β -glucuronidasa y se ha utilizado en plantas (Swoboda y cols., 1994).



Figura 26. Logotipo de la propuesta del proyecto para el análisis del linaje humano completo (www.lineage-flagship.eu/project).

Finalmente, uno de los métodos más prometedores para un futuro no muy lejano se basa en el hecho de que en todas las divisiones celulares se producen una media de unas 50 mutaciones por célula y por división, relacionadas con fallos en la maquinaria de replicación. Estas mutaciones, que no suelen desencadenar efectos

fenotípicos debido a que habitualmente se producen en regiones transcripcionalmente inactivas, pueden considerarse como marcas rastreables en el linaje. La descripción y secuenciación de tales marcas en el genoma (en microsatélites y otros puntos calientes de mutación) a nivel de célula única permite rastrear cómo se suceden en el linaje y por tanto permite reconstruir el linaje (Frumkin y cols., 2005; Salipante y Horwitz, 2006). De hecho, esta aproximación utiliza el mismo concepto que en los estudios filogénicos, considerando aquí cada célula como una especie distinta y el cigoto como el antecesor común. A pesar de lo laborioso de este método, debido a que no es invasivo ha llevado a plantear el proyecto de reconstrucción de todo el linaje de las células humanas (**Figura 26**; Wasserstrom y cols., 2008).

OBJETIVOS

La existencia de poblaciones astrogiales heterogéneas en el cerebro resulta de múltiples factores que actuando a nivel celular pueden clasificarse en intrínsecos o ambientales. El objetivo general que plantea este trabajo **es el análisis de la heterogeneidad astrogial intrínseca marcada desde el desarrollo y de sus implicaciones en el modelo de migración postnatal de neuroblastos al bulbo olfativo**. El diseño experimental se sustenta en la generación de una nueva herramienta de análisis clonal *in vivo* y en diversos modelos de cultivo, así como en técnicas de análisis de expresión génica a distintos niveles.

El objetivo general del trabajo se desgana en los siguientes objetivos precisos:

Objetivo 1. Análisis de la influencia de la heterogeneidad astrogial en el modelo de migración de neuroblastos al bulbo olfativo

- 1.1. Descripción in situ de las poblaciones astrogiales relacionadas con la migración.
- 1.2. Comparación de las monocapas astrogiales obtenidas a partir de tejido procedente de regiones relacionadas con la migración
- 1.3. Análisis de la influencia astrogial en un modelo de co-cultivo de astroglia y explantes de la ruta migratoria.
- 1.4. Estudio de la naturaleza de los factores moleculares astrogiales que influyen en la migración.
- 1.5. Comparativa de los patrones de expresión génica en las distintas poblaciones astrogiales relacionadas con la migración.

Objetivo 2. Generación de una herramienta de análisis clonal de astrocitos *in vivo*.

- 2.1. Diseño del sistema y producción de los distintos componentes en los que se basa.
- 2.2. Pruebas *in vivo* del funcionamiento del sistema de análisis clonal.

Objetivo 3. Aplicación del sistema de análisis clonal *in vivo* al estudio de la heterogeneidad astrogial en las regiones relacionadas con la migración.

- 3.1. Descripción del proceso de dispersión clonal astrocitaria.
- 3.2. Análisis de la composición clonal de astrocitos en corteza cerebral.
- 3.3 Análisis de la composición clonal de astrocitos en la ruta de migración rostral.
- 3.4. Análisis de la composición clonal en el bulbo olfativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MODELO ANIMAL Y SU MANIPULACIÓN

A. JUSTIFICACIÓN DEL MODELO

Un equilibrio entre la presencia de poblaciones de glía evolutivamente complejas y diversificadas y algunas facilidades prácticas como su pequeño tamaño, fácil manejo y corto ciclo reproductivo motivó la elección del ratón (**Figura 27**; *Mus musculus*; *Muridae*, *Rodentia*, *Mammalia*) como modelo de estudio. La gran cantidad de trabajos que han utilizado esta especie para el estudio del sistema nervioso, ha permitido el acceso a modelos de todo tipo y a un abultado cuerpo de referencias relacionadas con todos los aspectos de la glía, que sin duda alguna resultaron decisivas para este trabajo.

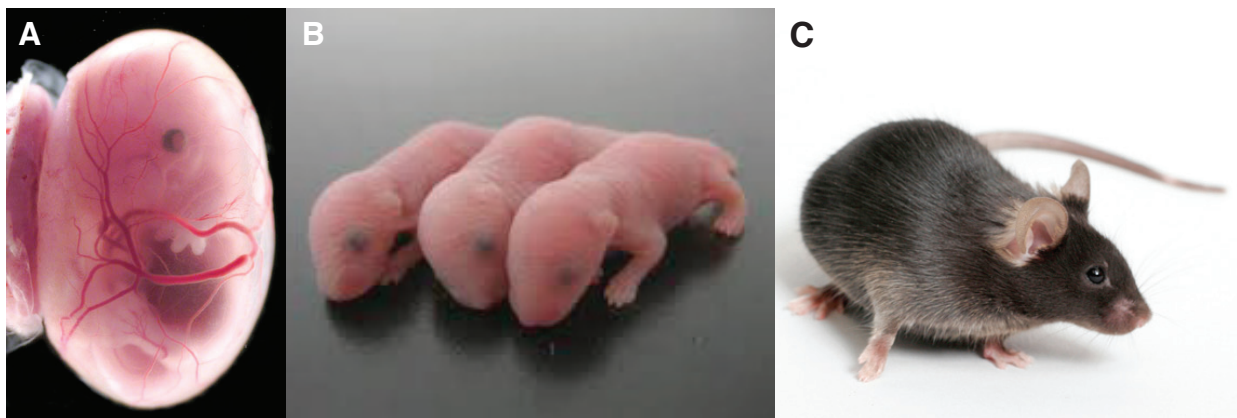


Figura 27. El ratón C57 como modelo animal de estudio. A. Estadío embrionario E15,5. **B.** Post-natales P3 . **C.** Adulto.

B. DESARROLLO DEL RATÓN

El periodo de gestación dura 19 días (Theiler, 1989), considerando el día en que se visualizó el tapón vaginal como día embrionario (E) 0 y el parto como día postnatal (P). Además, debido a que a partir de P30 las poblaciones astrocitarias apenas cambian, definimos esta edad como el mínimo para considerar a un ratón adulto.

C. PROCEDENCIA Y CONDICIONES DE CRÍA

En este trabajo se han empleado un total de 52 ratonas adultas preñadas (estadio E13-E15), 95 ratones postnatales (P1-P18) y 32 ratones adultos de la cepa C57BL/6, todos ellos procedentes del estabulario del Instituto Cajal (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) y de la empresa Charles River Laboratories. En estas instalaciones, se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (55-60%), en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto comercial esterilizada por irradiación.

Todos los experimentos realizados en este estudio se sometieron a la evaluación del comité ético en bienestar animal del Instituto Cajal y cumplieron con la normativa española (Real Decreto 1201/2005 de 10 de Octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y Ley 32/2007 de 7 de Noviembre para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio) y europea (Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Julio de 2003 por la que se modifica la Directiva 86/609/CEE). Asimismo, todos los procedimientos experimentales realizados en la Yale University fueron aprobados por su comité de uso y cuidado de animales.

D. ANESTESIA Y ANALGESIA

En función del método experimental y de la edad del animal se utilizaron distintos métodos de anestesia:

Cirugía intra-útero en ratonas gestantes: anestesia inhalatoria con Isoflurano (Isova® vet, Centauro) como principio activo. Para ello se introdujo a las ratonas gestantes en una cámara de inducción donde se les aplicó 2,5% de Isoflurano en un flujo de oxígeno de 0,8 L/m. Una vez inducidas se mantuvo la anestesia a 1,6% mediante una máscara apropiada para ratón. Después de la cirugía las ratonas fueron recuperadas en la cámara de inducción manteniendo el flujo de oxígeno sin Isoflurano.

Ratones embrionarios y postnatales P1-P3: hipotermia inducida tras situar a las crías en hielo previamente cubiertas por papel para evitar el contacto directo con el hielo.

Ratones postnatales P18 y adultos y extracción de embriones de ratonas gestantes: inyección intraperitoneal de equitesin (3 mL/Kg de peso del animal).

En todas las cirugías los ratones fueron tratados con inyecciones subcutáneas del fármaco antiinflamatorio no esteroideo Meloxicam (300 µg/kg; Metacam®, Boehringer Ingelheim) que ejerce un efecto analgésico **y con el fármaco** antimicrobiano enrofloxacin (5 mg/kg, Baytril®, Bayer) para prevenir posibles infecciones.

II. CULTIVOS CELULARES Y ORGANOTÍPICOS

A. CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN Y LIMPIEZA

Independientemente de la técnica de cultivo empleada, todo el procedimiento experimental se llevó a cabo en el interior de una campana de flujo laminar que dispone de un flujo continuo de aire vertical filtrado que permite el trabajo en horizontal en unas condiciones controladas de esterilidad. Estas campanas se encuentran en la sala de cultivos primarios del Instituto, la cual está sometida a irradiación con luz ultravioleta en la ausencia de los usuarios. Todas las superficies fueron pulverizadas con alcohol de 70° y el material quirúrgico fue esterilizado por irradiación

con luz ultravioleta. Todos los medios y soluciones se esterilizaron en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera extra de presión durante 15 minutos; o en el caso de que contuvieran componentes termosensibles, por filtración a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro. El vidrio y las puntas de las pipetas fueron esterilizados en autoclave. El resto del material estéril como agujas, tubos de plástico, placas, etc., fue comercial.

B. MEDIOS DE CULTIVO

- *Líquido cerebroespinal artificial (ACSF)*: medio sintético que intenta imitar al líquido cerebroespinal presente en el cerebro.

- *Solución salina tamponada Hanks (HBSS, Gibco)*: solución salina que permite mantener el pH y el balance osmótico, así como proporcionar a las células el agua y los iones inorgánicos esenciales, conservando, a corto plazo, el tejido cerebral vivo en buenas condiciones.

- *Medio de disección: L-15 (Gibco)* suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco). Se formuló originalmente para sistemas sin dióxido de carbono que requerían bicarbonato sódico. Está tamponado por su complemento de sales, amino ácidos y glucosa (que sustituye a la galactosa), de modo que ayuda a mantener el control del pH fisiológico. La incorporación del suero en este punto permite un paso gradual a las condiciones finales de cultivo.

- *Solución de agarosa de bajo punto de fusión*: su uso se fundamenta en la necesidad de aportar un medio semirígido para el corte que solidifique a temperaturas compatibles con la preservación del tejido en buenas condiciones. Además, su naturaleza porosa, permite la entrada del medio de disección al tejido, impidiendo su deshidratación.

- *Medio de cultivo 1*: medio no definido basado en los siguientes componentes:

1.- Advanced DMEM/F12 sin glutamina (Gibco): permite el crecimiento celular con escasa complementación de suero. Se basa en la combinación de componentes como etanolamina, glutatión, ácido ascórbico, insulina, transferina, albúmina de suero bovino rica en lípidos, selenito de sodio, metavanadato de amonio, sulfato cúprico y cloruro de manganeso. Utiliza un sistema de control del pH basado en bicarbonato sódico y un 5% de CO₂ ambiental.

2.- Suero Fetal Bovino: constituye uno de los suplementos más utilizados debido a su alto contenido en factores que promueven el crecimiento embrionario. De hecho proporciona muchos componentes definidos, pero también otros no definidos que satisfacen los requerimientos de un cultivo celular. La utilización de algún tipo de suero es crucial en este tipo de cultivos.

3.- Glutamax™ (Gibco): sustituye al aminoácido esencial L-Glutamina, que en condiciones de cultivo tiende a degradarse liberando amonio. Este suplemento se basa en una solución de L-alanil-L-Glutamina, un dipéptido estable que se rompe dentro de las células y produce dos moléculas de L-Glutamina. De este modo se evita la degradación de L-Glutamina y el consecuente aumento de amonio en el medio. Este aporte continuo de L-Glutamina mejora significativamente la supervivencia celular.

4.- Penicilina/estreptomicina (Gibco): antibióticos para el control de la posible contaminación bacteriana.

- *Medio de cultivo 2:* se trata de un medio no definido con similares características al anterior, que está basado en la combinación de :

1.-Medio Basal Eagle (Sigma Aldrich): predecesor del Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) y del Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME), aporta el equilibrio osmótico y de pH necesario, así como varios de los nutrientes requeridos para el cultivo celular.

2.-Suplemento N2 (Gibco): recomendado para el cultivo de neuronas postmitóticas.

3.-HBSS, Suero Fetal bovino, Penicilina/estreptomicina, Glucosa.

C. CULTIVOS DE ASTROCITOS EN MONOCAPAS

Una de las formas de crecimiento celular *in vitro* es el cultivo en monocapa. Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento suele producirse en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máximo recubrimiento de la superficie). De este modo, los cultivos celulares en monocapa consisten en una capa de células que crece adherida al recipiente que la contiene. Para mejorar la adherencia celular, estos recipientes suelen pretratarse con sustratos moleculares. En nuestro caso, las placas de cultivo fueron pretratadas con una solución de poli-L-Lisina (10 µg/mL; Sigma) durante una hora. Después se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron abiertas en cabinas de flujo.

Para la generación de cultivos de astrocitos en monocapa se siguió una modificación del método de Levison y McCarthy (1991), el cual, haciendo uso de la adherencia al sustrato como factor discriminante entre las distintas poblaciones neurales, permite eliminar aquellas células no astrocitarias. Sin embargo, al contrario que la mayor parte de cultivos de este tipo descritos en otros trabajos, la necesidad de aislar poblaciones astrocitarias muy concretas exigió escrupulosos métodos de disección y obtención del tejido. Para ello se partió de ratones postnatales de edades comprendidas entre P1 y P3. Una vez anestesiados y posteriormente decapitados, sus cerebros fueron rápidamente extraídos mientras se mantenían en HBSS frío. Posteriormente estos cerebros fueron embebidos en la solución de agarosa a 43 °C contenida en moldes de plástico y se orientaron, tras lo cual el molde se puso en hielo durante cuatro minutos. Una vez frío se extrajo el bloque de agarosa y se cortó con vibrátomo en secciones coronales de 200 µm (hasta la aparición de los ventrículos laterales). Para mantener el tejido vivo, el bloque de agarosa estuvo en todo momento sumergido en HBSS. Después y con ayuda de un pincel limpio, se transfirieron las secciones de tejido a placas Petri conteniendo medio de disección. A partir de estas secciones se diseccionaron a mano las regiones de interés (**Figura 28**), utilizando jeringas con aguja 25 Gauge y un microscopio de disección (Nikon SMZ1500). La disección se llevo a cabo mediante retroiluminación de la muestra, recortando incluso parte de la región de interés con el fin de

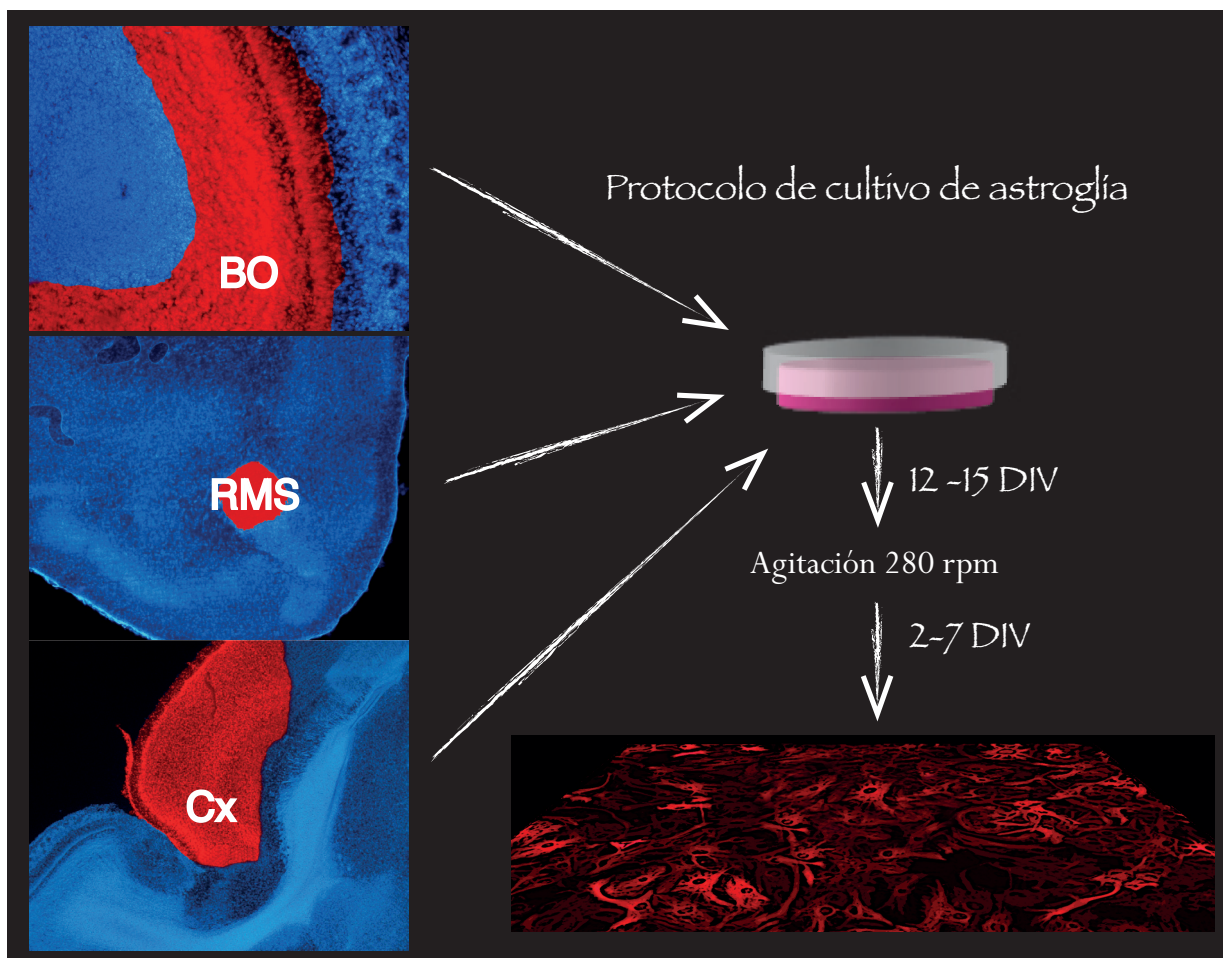


Figura 28. Protocolo utilizado en el cultivo de astrogía. Las distintas regiones de tejido fueron diseccionadas, obteniendo después una solución celular que fue cultivada durante 12-15 DIV. Estos cultivos fueron agitados a 37 °C y 280 rpm durante una noche, tras lo cual se trataron con tripsina-EDTA para obtener una solución celular que sería resembrada en placas de 48 pocillos durante 2-7 DIV para obtener monocapas confluentes.

minimizar la inclusión de células de regiones adyacentes, siendo, por su estructura esferoide, especialmente delicado en el caso del BO. A nivel de corteza se eliminaron escrupulosamente las meninges. Todas las regiones de interés se transfirieron por separado a tubos eppendorf conteniendo medio de disección.

Para reducir la posible contaminación microbiana, los trozos de tejido se lavaron dos veces con medio de disección y otra más con medio de cultivo. Para ello, una vez depositado el tejido en el fondo del tubo se aspiraba el líquido con una pipeta P-1000, y se añadía 1 mL del medio correspondiente, dejando que el tejido volviera a depositarse en el fondo del vial. En el último lavado se aspiraba todo el medio con el tejido, y se transfería a tubos Falcon de 15 mL. A continuación, se realizó una primera disociación mecánica pasando lentamente los trozos de tejido 25 veces a través de una punta de plástico acoplada a una pipeta P-1000,. Después se incubaron los tubos 10 minutos en un baño de agua a 37 °C. Tras la incubación, la suspensión resultante se centrifugó a 1000 rpm durante 7 minutos tras lo cual se descartó el sobrenadante y

se añadió 1 mL de medio de cultivo previamente atemperado a 37 °C. Posteriormente se llevó a cabo la segunda disociación mecánica siguiendo el método anterior a fin de eliminar los últimos agregados de tejido. A continuación se transfirió el medio de cultivo conteniendo las células de cada región a frascos de cultivo de 25 mL previamente tratados con poli-L-lisina y que contenían 1 mL de medio de cultivo. Finalmente los frascos se pasaron a un incubador dónde se mantuvieron en una atmósfera de 5% CO₂ a 37 °C, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana.

Después de 12-15 días DIV, se llevó a cabo la purificación de astrocitos mediante la agitación orbital a 280 rpm y 37 °C durante una noche. Esto permitió que el resto de células no astrocitarias como oligodendrocitos, neuronas y microglía se despegasen del sustrato, siendo posteriormente descartadas por aspiración del medio de cultivo. Los frascos, conteniendo principalmente astrocitos, se trataron con una solución de Tripsina-EDTA (Gibco), la cual combina la acción de una potente proteasa con el detergente EDTA, lo cual provoca que las células pierdan sus uniones al sustrato y se pueda obtener una solución de células individuales. Para reducir el tiempo de exposición a la tripsina-EDTA y permitir que las células se despeguen más eficazmente, se aplicaron a los frascos, dispuestos horizontalmente, golpes secos contra una superficie lisa y dura. Tras comprobar en el microscopio invertido de contraste de fases la ausencia de células en el fondo del frasco, se procedió a bloquear la solución de tripsina mediante inhibición por saturación con sustrato, añadiendo el mismo volumen de medio de cultivo que de solución de tripsina-EDTA. De este modo, la alta concentración en el suero de proteínas que actúan como sustrato de la tripsina y la dilución del EDTA a la mitad permiten que la solución de Tripsina-EDTA se inactive.

La solución de células individualizadas se transfirió a tubos Falcon de 15 mL que después se centrifugaron a 1000 rpm durante 7 minutos. Finalmente se repitió el protocolo de disgregación descrito anteriormente, se contó el número de células en una cámara de Neubauer y se ajustó con medio de cultivo la densidad requerida en cada experimento. De esta solución se añadieron 250 µL a placas de 48 pocillos. Después se pasaron al incubador y se mantuvieron en las condiciones mencionadas anteriormente.

D. CO-CULTIVO DE CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS

Este procedimiento, puesto a punto en nuestro laboratorio, permitió el estudio en condiciones de contacto, del comportamiento migratorio de los neuroblastos procedentes de explantes de RMS sobre monocapas de astrocitos (**Figura 29**).

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, los astrocitos se cultivaron sobre placas de 48 pocillos (4-6 x 10⁴ células/pocillo) y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia (de 2 a 7 días). A continuación, las placas se agitaron a 250 rpm durante dos horas a fin de quitar aquellas células no astrocitarias generadas durante el proceso de confluencia. En paralelo y tal como se detalla en el protocolo anterior, se diseccionaron explantes de RMS a partir de cortes coronales

de cerebros de ratón, recogidos en tubos tipo eppendorf mantenidos en hielo con medio de cultivo 1. . Después se aspiraron cuidadosamente y se dispusieron en la tapa de una placa de Petri de plástico para ser aspirados con una pipeta P-20 y depositados en el centro de cada uno de los pocillos con astrocitos. Esto se hizo muy minuciosamente, sin tocar la monocapa y expulsando muy lentamente el medio de cultivo que contenía el trozo de RMS. De este modo el explante de RMS se depositó en el fondo del pocillo, en contacto con la monocapa de astrocitos. Una vez emplazados todos los explantes y a fin de asegurar que cada explante se depositara en el fondo de su pocillo, se dejaron las placas en una superficie horizontal durante cinco minutos antes de meterlas en el incubador. Finalmente las placas multipocillo fueron introducidas en el incubador y el cultivo se dejó 1 DIV en las condiciones descritas anteriormente.

E. CO-CULTIVO DE CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS DE DISTINTO ORIGEN EN EL MISMO POCILLO

Estos experimentos se llevaron a cabo a fin de examinar la migración de neuroblastos procedentes de explantes de RMS, en presencia de dos monocapas de astrocitos de diferente origen. Debido a que ambas monocapas se generaron en el mismo pocillo, este procedimiento permitió analizar el efecto de los factores asociados a la superficie astrocitaria en un medio de cultivo compartido por ambos tipos de astrocitos (adaptado de Rydholm y cols., 2005).

Basado en los dos anteriores, este protocolo se diferencia en la creación de una barrera sin células que separa los dos tipos de monocapas astrocitarias. Esta barrera se consiguió dividiendo el pocillo con tiras de Parafilm® de aproximadamente 200 µm de ancho, cortadas bajo la lupa con las agujas utilizadas para la disección y aplicadas por presión mediante una pinza de relojero. Estas placas, expuestas a posible contaminación bacteriana, se lavaron primero con una mezcla de Etanol 70° y HCl 0.2M y después con agua destilada un par de veces y se mantuvieron bajo irradiación ultravioleta en la campana de flujo hasta ser utilizadas. A continuación se trataron con polilisina como se describió anteriormente.

Una vez preparadas las placas, se depositaron a cada lado de la barrera, dos gotas de 15 µl conteniendo $1,5 \times 10^4$ astrocitos de distintos orígenes cada una. Tras alcanzar la confluencia, la banda de parafilm fue cuidadosamente retirada mediante unas pinzas estériles en cabina de flujo, colocando un explante de RMS, en cada monocapa. En otros experimentos, únicamente un explante fue situado entre ambas monocapas. En todo caso los co-cultivos se mantuvieron en el incubador durante 1 DIV .

F. CO-CULTIVO DE TIPO NO CONTACTO ENTRE EXPLANTES DE RMS Y MONOCAPAS DE ASTROCITOS

El objetivo de este cultivo fue estudiar el efecto de los factores solubles liberados por los astrocitos

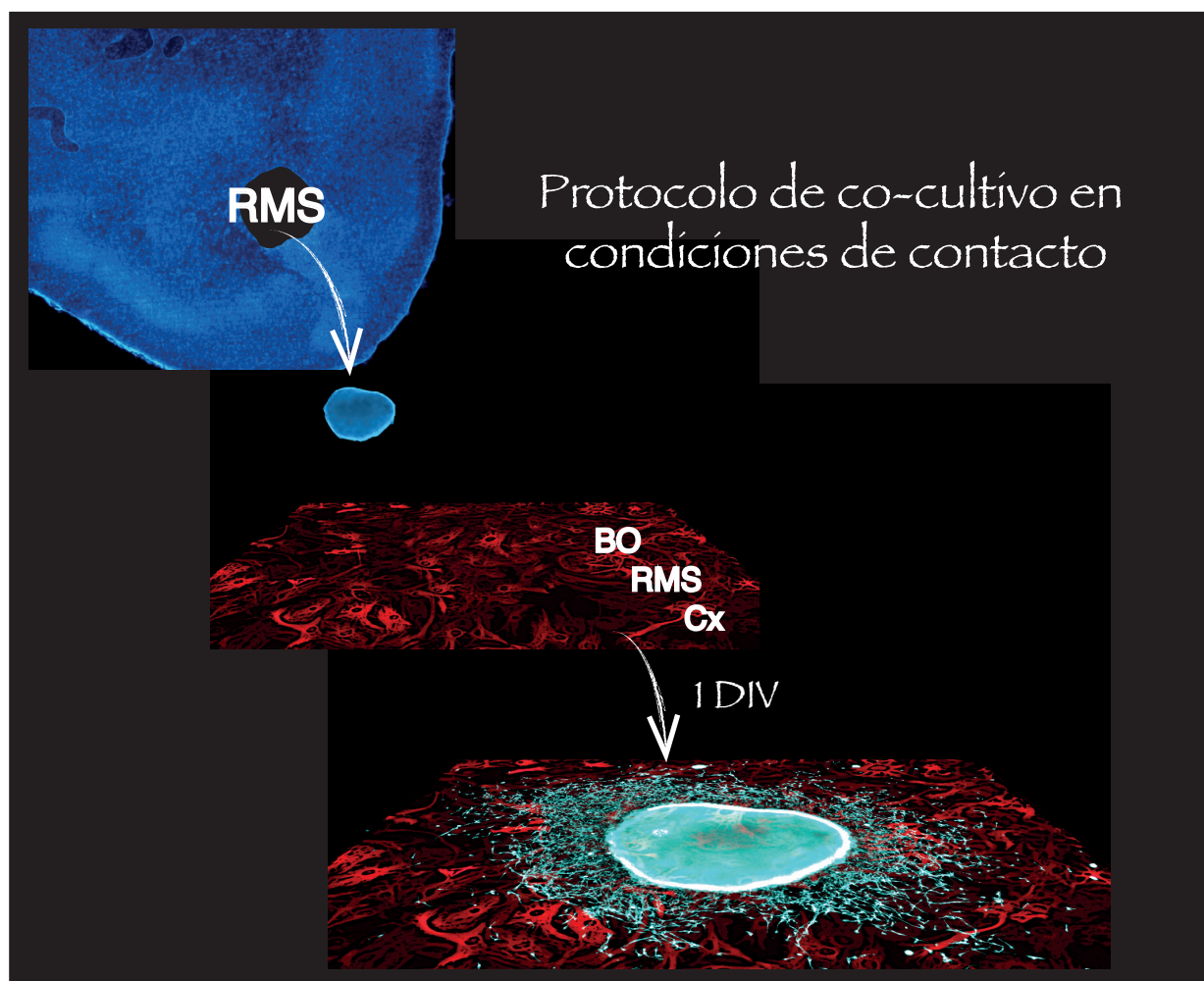


Figura 29. Protocolo para el co-cultivo de explantes de RMS sobre monocapas astrogliales de distinto origen. Este protocolo se basa en situar explantes de RMS sobre las distintas monocapas y dejar que los neuroblastos de la RMS migren durante 1 DIV.

en el comportamiento migratorio de las células de la RMS, generando un microambiente que impidiese el contacto entre astrocitos y neuroblastos, pero que permitiese la migración de neuroblastos desde los explantes de RMS. Este protocolo está basado en los cultivos clásicos de tejido cerebral en colágeno y cultivos en cubreobjetos suspendidos por pilares de parafina (**Figura 30**; Goslin y Banker, 1991). Sin embargo se evitó el uso de Matrigel, uno de los sustratos más utilizados para el estudio de la migración de neuroblastos, debido a que por ser una mezcla de componentes de matriz extracelular secretados por células del sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de ratón (Kleinman y Martin, 2005), podría enmascarar el efecto que los factores solubles de los astrocitos tienen sobre la migración.

En primer lugar se prepararon cubreobjetos circulares de vidrio previamente tratados con una solución de Etanol 70° y HCl 0.2 M y dos lavados con agua destilada. A continuación, se depositaron microgotas de parafina caliente con una pipeta Pasteur de vidrio, de modo que por tensión superficial las microgotas se mantuvieran como esferas. De este modo al enfriarse y darles

la vuelta, cada gota de parafina actuaría como un pilar que separase el cubreobjetos de la superficie que lo sostiene. Sobre estos cubreobjetos con patas de parafina, se dispusieron gotas de 10 μL de solución de colágeno.

Una vez colocadas las gotas de colágeno, los explantes de RMS se depositaron en la superficie, lo cual provocó que se embebieran lentamente en la todavía fluida matriz de colágeno, pero sin llegar al fondo porque para entonces ya se inicia el proceso de polimerización de la matriz. Pasados cinco minutos y una vez gelificado el colágeno por completo, los cubreobjetos con los explantes de RMS fueron

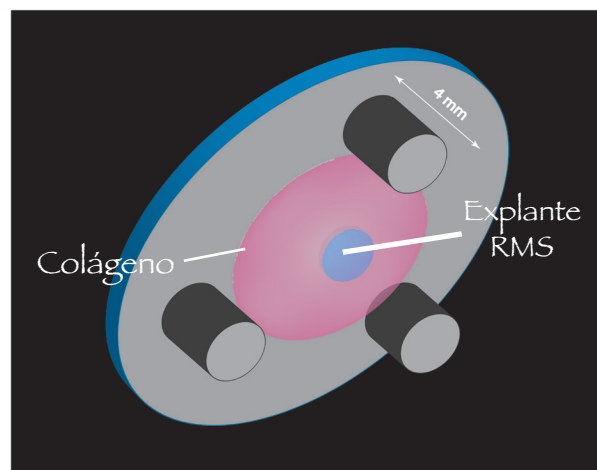


Figura 30. Soporte utilizado para los co-cultivos sin contacto en colágeno entre explantes de RMS y monocapas astrogliales de distinto origen.

invertidos y situados sobre monocapas de astrocitos. De este modo se evitó el contacto físico directo, si bien ambos tipos celulares podían compartir el medio de cultivo (400 μL). Estos cultivos fueron incubados durante 3 DIV en las mismas condiciones que el resto de cultivos.

G. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RODAJAS DE CEREBRO

Este tipo de cultivo permitió el estudio del comportamiento migratorio y proliferativo de los progenitores gliales, permitiendo un equilibrio entre la posibilidad de visualizar esos procesos y el mantenimiento de la estructura del tejido. Su validez como modelo se basa fundamentalmente en que los cortes no incidan transversalmente al eje de migración de las células. En nuestro modelo se utilizaron cortes coronales dado que la migración de las células ocurre primero en un plano coronal desde una zona dorsomedial hasta otra más ventrolateral y luego en el mismo plano hacia una región más dorsolateral donde ocurren la mayoría de eventos proliferativos que nos interesan (ver Relación entre la región electroporada y la migración de progenitores astrogliales, Resultados). Este plano de corte minimiza el daño ocasionado a las regiones donde las células objeto de estudio migran y proliferan in vivo en condiciones normales.

El protocolo utilizado es una modificación del descrito por Elias y Kriegstein (2007) que es prácticamente idéntico al descrito anteriormente para la obtención del tejido cerebral (ver Cultivos de astrocitos en monocapa) pero con la salvedad que aquí se utiliza medio ACSF en sustitución del HBSS y del medio de disección, así como medio de cultivo 2 en lugar del 1 (Ver Anexo I). Una vez seccionado el cerebro en rodajas de 250 μm , éstas fueron transferidas con un pincel a placas Petri de plástico con ACSF fresco, lo cual permitió eliminar los restos de agarosa. Después las secciones se transfirieron a soportes tipo Transwell® de 3 μm de tamaño de poro y 24 mm de diámetro, que debido a su naturaleza porosa, permiten mejorar el intercambio gaseoso

entre la rodaja y el medio (**Figura 31**). La transferencia de las rodajas se hizo directamente mediante la aspiración del medio con una pipeta Pasteur de vidrio invertida (a la cual se le quitó el filamento). Después, con ayuda de una pinza estéril, se situaron los soportes sobre placas de 6 pocillos, conteniendo cada uno de ellos 2 mL de medio de cultivo 2 atemperado. Después se retiró el ACSF de la parte de arriba del soporte mediante aspiración. El atemperado del medio de cultivo fue fundamental para que el líquido suba por capilaridad al lado superior del soporte, donde se sitúa la rodaja. Ese volumen que sube por capilaridad permite un continuo aporte de nutrientes sin que la rodaja se encuentra sumergida en medio de cultivo por completo, lo cual mejora enormemente su oxigenación y su supervivencia. Estos cultivos fueron mantenidos en el incubador (en las mismas condiciones descritas anteriormente) durante 2 DIV.



Figura 31. Placas y soportes tipo transwell® utilizados en los cultivos de rodajas de cerebro.

III. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

A. EXTRACCIÓN DE EMBRIONES DE RATONAS GESTANTES

Mediante esta técnica se obtuvieron los embriones de ratón que serían posteriormente fijados. Para ello se anestesió a las ratonas gestantes y se les realizó una laparotomía a fin de exponer los cuernos uterinos. Después de localizado el extremo ovárico de uno de los cuernos, con unas tijeras se cortó la capa muscular del útero correspondiente al primer embrión. Una vez retirada la pared muscular, se eliminaron sucesivamente la membrana decidua que quedaba expuesta tras quitar el músculo, la membrana de Reichert, y finalmente la membrana amniótica, dejando expuesto al embrión. Finalmente para extraer al embrión, se tiró de la placenta y se empujó por el extremo opuesto a la apertura realizada.

B. FIJACIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS

La fijación de células y tejidos celulares persigue su correcta conservación durante un periodo de tiempo variable, evitando los procesos degradativos que ocurren una vez que las células están muertas. Aunque se han utilizado múltiples técnicas y compuestos para alcanzar ese objetivo, uno de los protocolos más extendidos para la fijación de tejidos y células se basa en la aplicación de una solución de paraformaldehído. El paraformaldehído es un polímero del formaldehído (del

latín *formica* = hormiga) o metanal, descubierto en 1867 por el químico alemán August Wilhelm von Hofmann (**Figura 32**).

Este compuesto actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas presentes en el tejido o las células. Normalmente se utiliza a concentraciones próximas al 4 % en soluciones tamponadas e isotónicas. Su uso como agente fijador se ha extendido por su acción fijadora de lípidos que consigue una buena preservación del tejido, actuando como conservante y produciendo poca retracción tisular. Además es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, inmunocitoquímicas y de hibridación de ácidos ribonucleicos.

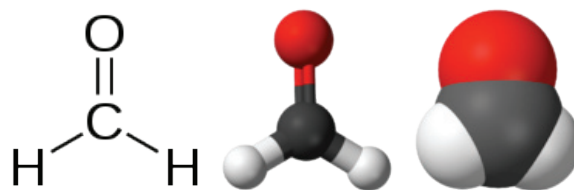


Figura 32. Estructura química del formaldehído. Su polímero el paraformaldehído fue utilizado como fijador de tejidos y células.

Para la fijación de cerebros en animales vivos optamos por un protocolo de perfusión intracardiaca. La perfusión es una de las formas más eficaces de fijación de tejidos y órganos en animales vivos y consiste en la administración de una o varias soluciones a través de los vasos sanguíneos que los irrigan, desplazando la sangre que los ocupaba anteriormente. Para la perfusión intracardiaca, se anestesió al animal, se le situó en posición de decúbito supino sobre una superficie de corcho, y se fijó mediante agujas en las extremidades. A continuación se realizó un corte en la piel a la altura del esternón, se separó la piel de las capas conjuntivas y se cortaron las costillas a fin de exponer el corazón. Debido a que tras ello el animal sufre un neumotórax que le provocará la muerte por asfixia, es crítico que el resto del protocolo se haga con presura. Una vez expuesto el corazón, se insertó en el ventrículo izquierdo la aguja de una palomilla de venoclip, conectada a una jeringa o a una bomba de perfusión con una solución de PFA 4% en PB 0,1M. Después se realizó una incisión en la aurícula derecha para permitir la salida de la sangre y la solución de fijación a través de la circulación de retorno. Durante el proceso se aplicó una presión constante a la jeringa que contiene el fijador (aproximadamente un mL por minuto) hasta que de la aurícula únicamente salió la solución del fijador transparente. Los síntomas de una buena perfusión son una rápida y fuerte contracción del animal que continua en una posterior rigidez del animal y el color blanquecino de sus órganos. Después se extrajo el cerebro de la cavidad craneal y se dejó en postfijación en PFA 4% en PB 0,1 M de 2 a 24 horas.

Para la fijación de los cultivos se utilizó el mismo fijador durante 20 minutos, seguido por lavados con PB 0,1 M.

C. CORTE DEL TEJIDO CEREBRAL

A pesar de la existencia de múltiples métodos de seccionamiento del cerebro, en este trabajo se eligió el corte por vibrátomo (Leica VT 1000S), ya que permite obtener cortes precisos desde 30

μm , sin necesidad de congelar el tejido y de manera bastante rápida. Para ello primero tuvimos que incluir el tejido en una solución de agar que debido a que tiene la misma textura que el tejido, proporciona un soporte que impide que la vibración de la cuchilla despegue o mueva significativamente el tejido. Para ello se calentó en microondas la solución de agarosa y se depositó en moldes cúbicos de plástico. Después, con la ayuda de unas pinzas se situó el cerebro y se orientó mínimamente, tras lo cual se dejaron dichos moldes sobre una superficie horizontal hasta que el agar se solidificó. Después se tallaron los bloques de agar y se situaron en la plataforma del vibrátomo, cubriéndose con PB 0,1 M. En este sistema el corte se produce por una cuchilla que se mueve a velocidad regulable y vibra a alta frecuencia (también regulable). Cuando se encuentra con el tejido produjo cortes limpios que fueron recogidos automáticamente en PB 0,1 M, pasándose a placas multipocillo con la ayuda de un pincel limpio.

IV. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

A. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS

Con el fin de distinguir células y tejidos en función de la expresión de ciertas proteínas usadas como marcadores del tipo celular, se llevaron a cabo tinciones inmunológicas simples y dobles, basadas en la unión específica antígeno-anticuerpo. Para este tipo de tinciones se utilizan anticuerpos específicos generados contra una proteína de interés (que en nuestro caso fueron todos comerciales) y que pueden ser monoclonales (aquellos que están formados por un único tipo de anticuerpo y reconocen únicamente un epítipo de la proteína) o policlonales (que en realidad son una mezcla de anticuerpos que reconocen distintas partes de la proteína). Estos anticuerpos son denominados primarios y pueden estar hechos en distintas especies, generalmente ratón, rata y conejo. A su vez se han generado otros anticuerpos (que generalmente son comerciales) que reconocen a los anticuerpos primarios de las distintas especies y que van acoplados a un marcador que se puede visualizar directa o indirectamente. En los casos en que en este trabajo se utilizaron anticuerpos secundarios de detección indirecta, se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados que fueron revelados con estreptoavidina (molécula muy afín a la biotina) acoplada a fluoróforos.

En este trabajo se han llevado a cabo protocolos inmunohistoquímicos (en tejido), que fueron aplicados sobre rodajas de cerebro de ratones de distinta edad, previamente perfundidos con PFA 4% en PB 0,1 M, postfijados y cortados en secciones de 30-50 μm . Asimismo también se han llevado a cabo protocolos de inmunocitoquímica sobre monocapas de astrocitos y/o explantes de RMS previamente fijados con PFA 4% en PB 0,1 M. En ambos casos, las muestras lavadas primero con PBS-T 0,2% durante 10 minutos, lo que favoreció la penetración del anticuerpo en las células y fue muy recomendable por tanto para la detección de antígenos intracelulares. En el caso de las rodajas cerebrales o explantes embebidos en colágeno, los lavados se hicieron en placas

Epítopo	Tipo	Huésped	Dilución	Procedencia	Referencia
GFAP	PC	Conejo	1:500	Dako	Z 0334
B-Tubulin (clase III)	MC	Ratón	1:1000	Dr. Frankfurter	MAB1637
Doublecortina	PC	Cobaya	1:2000	Millipore	AB591
Olig2	PC	Conejo	1:1000	Millipore	AB9610

Figura 33. Tabla de anticuerpos primarios utilizados.

multipocillo con rejillas acopladas que facilitaron la aspiración sin perder las muestras. A partir de este paso las placas fueron puestas en agitación ligera. Posteriormente y con el fin de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos, tanto las secciones como los cultivos se trataron durante 45 minutos con 2 mL de solución de bloqueo que contenía albúmina de suero bovino (Sigma) al 2% en PBS-T 0,1%. A continuación se incubaron durante una noche a temperatura ambiente, en anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (**Figura 33**). En los casos en

Molécula	Marcador	Dilución	Procedencia	Referencia
Estreptoavidina	Alexa 633	1:2000	Molecular Probes, Inc	S-21375
Estreptoavidina	Alexa 488	1:2000	Molecular Probes, Inc	S-11223
Lectina de Tomate	Biotina	1:1000	Sigma-Aldrich	L0651

Figura 34. Tabla de otras moléculas utilizadas en los marcajes.

los que se marcaron los vasos sanguíneos, en lugar de poner un anticuerpo primario, se utilizó como marcador a la lectina de tomate acoplada a biotina (**Figura 34**). Al día siguiente se lavaron en PBS-T 0,1% (3 x 5 min) y se incubó durante 90 minutos en el correspondiente anticuerpo secundario (**Figura 35**) diluido en PB 0,1 M. En el caso de anticuerpos secundarios biotinilados o de la lectina de tomate, las muestras se lavaron después con PB 0,1M (3 x 5 min) y se incubaron con estreptoavidinas acopladas a fluoróforos. Por último y tras lavar las muestras con PB 0,1 M (3 x 10 min), se marcaron con el marcador nuclear fluorescente bisbenzimidá (10 µg/ml, Sigma). En algunos casos se requirió el uso de Draq5™ (Biostatus Limited), otro marcador nuclear que emite en el rango del rojo lejano y que fue incorporado en el paso del anticuerpo secundario. En este punto es importante aclarar que siempre y cuando se utilizaron fluoróforos que emitían en el rango del azul todas las placas y pinceles utilizados no estuvieron jamás en contacto con bisbenzimidá ya que emite en el rango del azul y es muy difícil eliminarla con lavados.

Una vez terminada la reacción inmunoquímica las secciones se montaron en portaobjetos. Después de dejarlas secar brevemente, se cubrieron con una solución de PB 0,1 M y glicerol (1:1)

Epítopo	Marcador	Huésped	Dilución	Procedencia	Referencia
IgG (H+L) ratón	Alexa 488	Cabra	1:200	Molecular Probes, Inc	A11001
IgG (H+L) Conejo	Alexa 568	Cabra	1:2000	Molecular Probes, Inc	A11011
IgG (H+L) Cobaya	Biotina	Cabra	1:2000	Atom-Vector	BA-1000

Figura 35. **Tabla de anticuerpos secundarios utilizados.**

y un cubreobjetos que fue sellado con laca de uñas.

En todos los casos se incluyó una serie control en la cual las secciones de tejido y las muestras de cultivo fueron incubadas omitiendo el anticuerpo primario, en cuyo caso no se observó ningún tipo de marcaje.

B. TÉCNICAS DE RT-PCR EN TIEMPO REAL A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO

Es una de las variantes de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la que se utiliza dicha reacción para estimar la cantidad inicial de RNA presente en una muestra. La RT-PCR cuantitativa se basa en la amplificación del cDNA generado a partir del mRNA presente en una célula, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (**Figura 36**). El paso de mRNA a cDNA es llevado a cabo por una retrotranscriptasa (de ahí viene el nombre de RT-PCR y no de *real time*, como se suele pensar) en un ciclo anterior a la reacción de PCR. La incorporación a la reacción de amplificación de un agente intercalante (SYBR Green) que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y se acopla a los ácidos nucleicos que lo forman, permite seguir cuantitativamente el proceso de amplificación. Este agente intercalante incrementa notablemente su tasa de emisión

fluorescente por un proceso de transferencia energética mediante resonancia de fluorescencia (FRET) cuando está unido a la doble hélice de DNA. De este modo la cantidad de fluorescencia

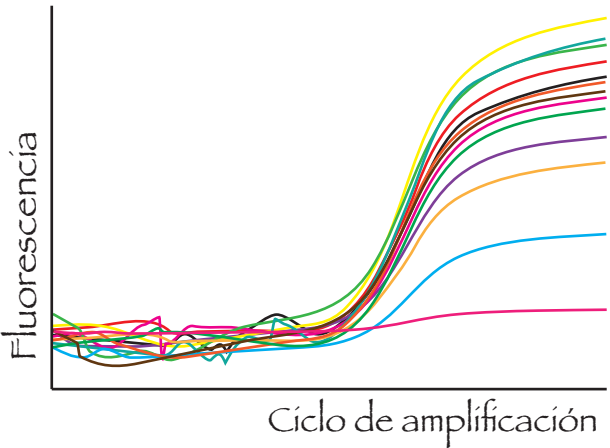


Figura 36. **Ejemplo de curvas típicas de amplificación en una reacción de RT-PCR cuantitativa.** Tras un periodo en el que la fluorescencia oscila de modo ruidoso, la amplificación se produce exponencialmente como indica tal aumento en fluorescencia.

es un indicador directo de la cantidad de DNA de doble cadena presente en la muestra. Debido a que la amplificación del DNA sigue una curva exponencial en la que a partir de una molécula de DNA se generan dos, el nivel de mRNA presente inicialmente en la muestra es proporcional al número de ciclos de amplificación necesarios para llegar a un umbral fijado por el investigador. Por ello este protocolo se lleva a cabo en termocicladores especiales que además de controlar la temperatura de la muestra, tienen sensores para medir la cantidad de fluorescencia emitida. Además, la presencia de cebadores específicos en la reacción de la polimerasa permite amplificar específicamente el mRNA de un gen concreto.

i. Muestras procedentes de cultivos de astrocitos

Con el fin de analizar mediante RT-PCR en tiempo real, la cantidad de mRNA relacionado con genes de matriz extracelular y adhesión celular producido por poblaciones de astrocitos de distinto origen, se utilizó un kit comercial de RT-PCR cuantitativa para analizar la expresión de 84 de estos genes (PAMM-013; SABiosciences). En primer lugar y haciendo uso del kit RNEasy (Qiagen) se aisló el RNA total a partir del pellet de cultivos de astrocitos obtenidos según los protocolos descritos anteriormente. El RNA de distintos orígenes (500 ng) fue utilizado siguiendo el protocolo del kit para generar el ADNc y después parte de este cDNA fue sometido a un control de calidad mediante otro array de RT-PCR (PAMM-999; SABiosciences). De este modo se descartó la presencia de ADN genómico e impurezas que podrían afectar al ensayo de RT-PCR. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción y se añadió a los 96 pocillos conteniendo los cebadores específicos para cada gen y controles internos. La reacción de RT-PCR y la emisión de fluorescencia fue registrada a lo largo del ensayo por el sistema del termociclador (Chromo 4 Four-Color Real- Time PCR Detector; MJ Research). Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

ii. Muestras procedentes de tejido

En este caso el tejido se obtuvo de ratones postnatales P2 con el protocolo descrito anteriormente y fue rápidamente congelado en nieve carbónica y después a -80 °C hasta su uso. Una vez homogeneizado el tejido, se extrajo el RNA total (ver Muestras procedentes de cultivos de astrocitos) y fue sometido a un ensayo de RT-PCR haciendo uso del kit comercial Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Applied Biosystems). Este ensayo se realizó separadamente para cada región cerebral y para cada uno de los siguientes genes: *Thbs-1* (PrimerBank ID: 7110725a1), *Sparc* (PrimerBank ID: 6678077a1), *Ecm1* (PrimerBank ID: 4103926a1), *Cttna1* (PrimerBank ID: 6753294a1), *Lama3* (PrimerBank ID: 1922889a1), *Cdh2* (PrimerBank ID: 6680902a1). Todas las secuencias de estos *primers* fueron obtenidas de PrimerBank (Wang y Seed, 2003). Los datos obtenidos fueron normalizados a la expresión de ARN ribosomal 18S (sentido-CGGCTACCACATCCAAGG, anti-sentido-GCTGCTGGCACCAGACTT).

V. GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

Mediante el uso de técnicas de biología molecular se pueden generar constructos de DNA que pueden cumplir infinidad de funciones para el investigador. Debido a que las reglas que controlan la expresión de este tipo de constructos son casi universales entre todos los organismos y tipos celulares, el uso de estas técnicas se revela hoy en día como fundamental en múltiples áreas de la biología. En este trabajo se generaron constructos para el marcaje específico de poblaciones clonales de astrocitos.

A. CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para el corte con enzimas de restricción se partió, cuando fue posible, de 10 µg de DNA y se siguieron las condiciones de cantidad de enzima que minimizasen los tiempos de incubación, con la precaución de que la actividad de la enzima no excediese los límites impuestos por la *Star activity* o actividad aleatoria que aparece para algunas enzimas en condiciones de alta concentración. Siguiendo el protocolo del fabricante, el DNA fue cortado en los sitios específicos reconocidos por cada enzima mediante su incubación con cantidades definidas del tampón correspondiente que establece las condiciones necesarias y cantidades también definidas de enzima. En todos los casos el volumen final fue ajustado con agua destilada a 20 µL. Para todas las enzimas la temperatura de incubación fue 37 °C y los tiempos variables en función de la cantidad de enzima y de DNA, de la efectividad de cada enzima en el tampón usado y del número de sitios de corte que tuviera dicha enzima en el patrón en el que fue establecida su actividad, comparado con el número de sitios de corte que la enzima tiene en nuestro DNA. Para digestiones simultáneas con dos enzimas se buscó el tampón con más actividad para ambas. Cuando el mismo tampón pero a concentraciones distintas fue óptimo para ambas, se incubó primero con la enzima que requería menos concentración y luego se añadieron la segunda enzima y la cantidad de tampón necesaria para obtener la concentración requerida. Cuando fue posible las enzimas fueron inactivadas mediante incubación a altas temperaturas (desde 65 °C a 85 °C dependiendo de las instrucciones del fabricante). Las enzimas utilizadas en los clonajes fueron las siguientes: BamHI, EcoRI, XbaI y XhoI. Todas estas enzimas producen extremos cohesivos lo cual permite una mejor ligación posterior.

B. SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Esta técnica se basa en la migración de los fragmentos de DNA (intrínsecamente cargados con carga negativa aportada por los grupos fosfato) desde el polo negativo hasta el positivo a través de un gel de agarosa en presencia de un campo eléctrico. Debido al entramado poroso de la

agarosa los fragmentos más pequeños migran más fácil y rápidamente que los fragmentos grandes por impedimento físico.

Para llevar a cabo esta técnica se preparó una mezcla de agarosa (ver anexo I) que se depositó en una cubeta y sobre la cual se situó un peine de plástico para formar 8 pocillos, dejándose enfriar posteriormente. Después se añadió TAE 1X hasta cubrir el gel y se pipetearon en los pocillos los distintos fragmentos de DNA diluidos en tampón de carga (Fermentas). Este tampón contiene dos indicadores de tamaño: Xileno Cianol FF (4160 pb) y azul de bromofenol (370 pb). También se aplicaron 3 μ L de GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) como patrón de tamaños. Después se dejó migrar la muestra durante un tiempo variable próximo a 40 minutos aplicando un voltaje de 200 V hasta que el bromofenol se encontraba a más de 2/3 del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las muestras se visualizaron mediante irradiación con luz UV

C. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Este protocolo permitió aislar el DNA separado previamente por su tamaño en un gel de agarosa. Para ello se visualizó el gel mediante luz ultravioleta en un transiluminador y rápidamente se cortó la banda de agarosa correspondiente al fragmento de interés. En este paso es importante protección para evitar la exposición a la luz ultravioleta y rapidez ya que el DNA se degrada cuando es expuesto a esta luz. Partiendo de las bandas de agarosa, este procedimiento se llevó a cabo mediante el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) y siguiendo el protocolo incluido por el fabricante que se basa en la disolución de la agarosa y en el paso por columnas con afinidad por el DNA.

D. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Mediante este proceso se producen enlaces fosfodiéster entre los grupos fosfato de fragmentos de DNA con extremos romos o compatibles en su secuencia, lo cual une ambos fragmentos. Esta ligación puede ser múltiple, permitiendo por ejemplo circularizar un plásmido incluyendo un nuevo fragmento de DNA.

Este protocolo se llevó a cabo a partir de fragmentos de DNA previamente purificados y conteniendo al menos un grupo fosfato en 5'. Para ello se utilizó la actividad de la ligasa T4 incluida en el kit comercial Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas). En todo momento se siguió el protocolo del fabricante, basado en una modificación que optimiza enormemente los tiempos de incubación. El ratio de fragmento:plásmido utilizada fue 3:1 y se incluyó siempre una reacción control en la cual el fragmento fue sustituido por agua destilada.

E. DESFOSFATACIÓN DE PLÁSMIDOS CORTADOS PREVIAMENTE

Mediante este protocolo fue posible reducir el número de colonias que no incluían el fragmento de DNA deseado tras una ligación. Se basa en la eliminación de los grupos fosfato en 5' de un plásmido previamente cortado. Esto evita que la ligasa los use para recircularizar el plásmido lo cual permitiría que por su forma circular las bacterias lo repliquen y por la resistencia incorporada en el plásmido puedan crecer incluso en presencia del antibiótico de selección. Esto es especialmente útil cuando se hacen ligaciones con fragmentos de extremos romos. Es fundamental que sea desfosfatado el vector y no el vector y el inserto ya que tiene que existir al menos un grupo fosfato en 5' para que ocurra la reacción de ligación. Este protocolo se basó en la utilización del kit comercial FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas).

F. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS CON PLÁSMIDOS

Este procedimiento permite permeabilizar transitoriamente la pared y membrana bacteriana posibilitando el acceso de ciertas moléculas presentes en el medio exterior, en nuestro caso plásmidos de DNA. A pesar de que esta permeabilización puede también provocarse mediante la aplicación de corrientes eléctricas o por choque térmico, nuestro protocolo se basó en la aplicación de químicos para producir bacterias competentes. Esto se llevó a cabo mediante el kit comercial TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas) que produce bacterias competentes con una eficacia de transformación aproximada de 10^7 colonias transformadas por μg de DNA plasmídico. La línea de bacterias utilizada fue la E. Coli JM107 (Fermentas) con el siguiente genotipo: *F⁺ traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 / e14⁻ (McrA⁻) Δ(lac-pro) endA1 gyrA96 (Nal^r) thi-1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) glnV44 relA1*.

Una vez llevado a cabo el protocolo de transformación, las bacterias fueron sembradas con asa de siembra en placas de agar y medio Luria Broth (LB) con el antibiótico de selección (proporcionadas por el servicio de biología molecular y celular del Instituto Cajal, en adelante SBMC) e incubadas durante al menos 12 horas a 37 °C.

G. PREPARACIÓN DE STOCKS DE GLICEROL

Para la correcta conservación de las bacterias conteniendo los plásmidos de interés, se prepararon stocks de glicerol. El glicerol actúa como crioprotector reduciendo la formación de cristales de hielo que dañan a las bacterias y permitiendo su congelación. Para su preparación se mezclaron 800 μL de un cultivo de bacterias (procedente de un cultivo de 5 mL incubado entre 6 y 8 horas) y 200 μL de glicerol, que se congeló rápidamente en nieve carbónica, conservándolo a -80 °C.

H. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA MEDIANTE PCR

Este protocolo permite la amplificación de fragmentos de DNA específicos mediante una reacción en cadena de la DNA polimerasa y cebadores específicos para el fragmento deseado. En múltiples ocasiones se utiliza para añadir una región pequeña en uno de los extremos del fragmento de DNA deseado.

En nuestro caso, las condiciones de la reacción de polimerización se establecieron en función de la longitud y secuencia tanto del amplicon (fragmento a amplificar) como de los cebadores. En todas las reacciones se incluyó un control de la reacción en el que el DNA que sirvió como molde fue sustituido por agua destilada. Este protocolo fue llevado a cabo por el SBMC del Instituto Cajal en las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción: DFS-Taq Polimerasa (1/100; Bioron), tampón de la enzima (1X), $MgCl_2$ (50 ó 100 mM), dNTPs (10 mM), cebadores (20 ó 100 μM), DNA molde a amplificar (funciona desde nanogramos; 1/100 – 1/10 dilución en volumen) y H_2O destilada hasta completar el volumen final (generalmente 50 μL). Para fragmentos mayores de 1 Kb se utilizó una polimerasa de alta fidelidad en la polimerización que reduce el número de posibles mutaciones introducidas en la secuencia (Expand High Fidelity polimerase; Roche).

Protocolo de PCR:

4-10 minutos a 94-95 °C.

30 ciclos de:

30 segundos ó 1 minuto a 94 °C.

30 segundos ó 1 minuto a 55 ó 60 °C (fase de *annealing*).

1-2 minutos a 72 °C.

7 minutos a 72 °C.

I. INSERCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA AMPLIFICADOS POR PCR EN VECTORES MEDIANTE CLONAJE TA

A menudo el clonaje de fragmentos amplificados por PCR no es en la práctica muy efectivo. Por esta razón todos los fragmentos, aquí amplificados, fueron clonados previamente en un plásmido mediante clonaje TA. Este clonaje permite la inserción de un fragmento amplificado por PCR en el marco de lectura del gen LacZ de modo que las colonias que incorporan dichos fragmentos pueden ser seleccionadas por su color blanco cuando crecen en presencia de X-Gal. Este protocolo se basa en que las polimerasas Taq tienen una actividad transferasa terminal no dependiente de la secuencia que están polimerizando (molde), añadiendo una única desoxiadenosina a los extremos 3' de los productos de PCR. Esta única base se usará para el clonaje en un vector lineal con extremos cohesivos con una desoxitimidina en 3'. Esto permite una ligación eficaz. Además en nuestro protocolo el vector lleva unido covalentemente a dicha desoxitimidina a la Topoisomerasa I del virus Vaccinia de modo que se facilita enormemente la ligación y no precisa de una reacción adicional de ligación. Partiendo del fragmento de interés

amplificado y purificado en gel de agarosa, el procedimiento se basó en la utilización del kit comercial TOPO TA Cloning® (Invitrogen) y fue 100 % eficaz en nuestras manos. A pesar de que se requiere un paso extra, ahorró mucho tiempo en el clonaje de este tipo de fragmentos de otro modo bastante ineficaz.

J. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Con el fin de obtener grandes cantidades de un plásmido para experimentos posteriores, se cultivaron bacterias a partir de colonias o de un stock en glicerol. Para ello, y en condiciones de microbiología se picó de dichas fuentes con una punta de plástico estéril que se depositó en recipientes conteniendo medio LB y el antibiótico de selección. Estos recipientes fueron tapados e incubados durante al menos 15 horas en un agitador orbital a 37 °C. En los casos en los que el volumen de cultivo fue muy grande, se cultivó primero en un volumen de 5 mL durante unas 4 horas y después se echaron esos 5 mL en el volumen mayor. La cantidad de DNA obtenida y por tanto el volumen de cultivo del que se parte determinó el tipo de protocolo utilizado, aunque todos se basaron en la lisis alcalina (salvo el protocolo de Miniprep que utiliza una lisis especial) y posterior purificación en columnas de resina de intercambio aniónico (en el kit de Miniprep el fabricante no lo especifica) utilizando kits comerciales.

Para un rendimiento en el orden de 5 µg de DNA se utilizaron 2 mL de medio de cultivo y el kit de Miniprep FastPlasmid Mini Kit (5 Prime).

Para un rendimiento en el orden de 50 µg de DNA se utilizaron 100 mL de medio de cultivo y el kit de Midiprep JetStar 2.0 (Genomed GmbH).

Para un rendimiento en el orden de 500 µg de DNA se utilizaron 500 mL de medio de cultivo y el kit de Maxiprep JetStar 2.0 (Genomed GmbH).

K. CONFIRMACIÓN DE LA FIDELIDAD DE LOS CLONAJES

Con el fin de asegurar que los clonajes realizados fueron correctos se llevaron a cabo las siguientes comprobaciones (crecientes en esfuerzo y fiabilidad):

- *Comparación con la placa control en la reacción de ligación:* la inclusión de un control de ligación en el cual se omitió el fragmento permitió conocer aproximadamente el porcentaje de colonias que no lo habían incorporado y simplemente se trataba de colonias que o bien habían recircularizado el DNA o bien se habían transformado con vector no digerido. En general el experimento de clonaje fue descartado cuando el número de colonias observadas en la placa con el fragmento fue menor que el doble de las colonias control. Esto ahorró mucho tiempo en comprobaciones posteriores.

- *Digestión con enzimas de restricción específicas:* en todos los casos los constructos supuestamente generados fueron “interrogados” mediante cortes de restricción que producían bandeos diferenciales tras la electroforesis en función de si el fragmento en cuestión se había incorporado o no.

-*Secuenciación*: permitió asegurar con absoluta fiabilidad la fidelidad del clonaje. Para secuenciar ciertas regiones de DNA, se encargaron iniciadores (oligonucleótidos) específicos de una secuencia aproximada de 25 mer (Sigma Aldrich) con homología por una región de unas 50 pb anterior a la región a secuenciar. Todas las secuenciaciones de este trabajo fueron encargadas a la empresa Secugen.

L. ESTRATEGIAS DE CLONAJE

Todas las construcciones fueron generadas a partir del plásmido PB-GFAP-EGFP, que contiene los siguientes elementos:

Secuencias terminales invertidas del transposón Piggybac: permiten insertar la secuencia que flanquean en el genoma en presencia de la actividad de la transposasa Piggybac .

- *Promotor hGFAP*: este promotor es una versión reducida de las regiones reguladoras que en condiciones normales controlan la expresión *in vivo* del gen GFAP humano. En nuestro caso hemos elegido el fragmento de 2,2 Kb desde -2163 (respecto al origen de transcripción) a +47, habiendo sido sustituido el codón de inicio ATG por un TTG. Esto es importante ya que la región más allá de +1 es esencial para la correcta transcripción del gen (Besnard y cols., 1991). Este pequeño fragmento es conocido con el nombre de *gfa2* y dirige específicamente la expresión de genes reporteros a las poblaciones astrogiales en ratón (Brenner y cols., 1994).

- *Proteína fluorescente reportera*: permite visualizar por microscopía de fluorescencia aquellas células que tienen activado el promotor correspondiente. Esta secuencia incluía en 5' justo antes del codón de inicio, la secuencia consenso tipo Kozak **CGCCACC** para favorecer que los ribosomas reconozcan el codón de inicio.

- *Señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina*: mejora la expresión de la proteína induciendo la poliadenilación del mRNA, lo cual conlleva su mayor estabilidad.

- *Resistencia a Ampicilina*: permite la selección de aquellas colonias de bacterias que adquieren el plásmido. El crecimiento del cultivo en condiciones de selección permitirá aislar grandes cantidades de plásmido.

- *Origen de replicación pUC*: es la región del plásmido a la cual se une la maquinaria replicativa de las bacterias. El pUC es un origen de replicación de bacterias, denominado de alta copia ya que permite la existencia entre 150 y 200 copias de plásmido por célula en contraste con los orígenes de baja copia como pBR322 que permiten que únicamente entre 25 y 50 copias por célula. Un gran número de copias permite mayor estabilidad del plásmido, aunque reduce la tasa de crecimiento lo cual implica que las células con menor número de plásmidos dominen el cultivo ya que crecen más rápido. El origen de replicación también determina la compatibilidad del plásmido ya que no pueden coexistir en una célula bacteriana dos plásmidos distintos con el mismo origen de replicación.

Para la generación de dicho plásmido se amplificó por PCR un pequeño fragmento del

promotor hGFAP, utilizando el vector pHR'-cppt-hGFAP-GFP-WPRE-SIN (proporcionado por la Dra. Lundberg, Lund University) como molde (ver estrategia de clonajes, **Figura 37**). Para esta reacción se utilizó un cebador *forward* que contenía un sitio para la enzima de restricción XhoI en la región próxima al extremo 5' (no homóloga por tanto a la secuencia a amplificar) y un cebador *reverse* completamente homólogo a la secuencia. El fragmento así amplificado fue posteriormente clonado en el vector pCRII-TOPO® TA (Invitrogen) mediante clonaje TA. Después fue digerido mediante una doble digestión con XhoI y XbaI (presente en la parte 3' del promotor de GFAP del fragmento amplificado) y purificado desde un gel de agarosa. El resto del promotor hGFAP fue extraído mediante doble digestión con XbaI (presente en la región del promotor) y BamHI (fuera de la región del promotor en la región 3') y purificado en gel de agarosa. Después se digirió el vector PB-UbC-EGFP (proporcionado generosamente por el Prof. Bradley, Wellcome Trust Sanger Institute) con XhoI y BamHI (que flanqueaban el promotor UbC) y se desfosfataron sus extremos 5'. Este plásmido contiene las secuencia terminales del transposon Piggybac entre las cuales se encuentra el promotor ubicuo UbC (correspondiente al gen humano de la ubiquitina C) y el gen reportero EGFP. Después el promotor hGFAP fue reconstituido mediante la triple ligación dirigida entre los dos fragmentos descritos y el vector previamente digerido y desfosforilado, lo cual a su vez eliminó el promotor Ubc dejando el EGFP en condiciones óptimas para ser regulado por el promotor hGFAP.

El plásmido resultante PB-GFAP-EGFP, fue utilizado para el reemplazo del EGFP por el resto de fluoróforos reporteros (mT-Sapphire, mCerulean, YFP, mKO y mCherry). Para ello se llevó a cabo la doble digestión con BamHI y EcoRI y posterior desfosfatación de extremos 5', eliminando la parte que codifica para el EGFP ya que ambos sitios flanqueaban esta secuencia. Por otro lado se amplificaron por PCR el mT-Sapphire, a partir del vector pRSET-mT-Sapphire (proporcionado por el Dr. Griesbeck) y el resto de fluoróforos, a partir del plásmido CMV-Brainbow-1.1 M (Addgene), mediante cebadores *forward* conteniendo un sitio de digestión BamHI (no homólogo a la secuencia molde) y *reverse* conteniendo un sitio EcoRI (también no homólogo) en las regiones próximas al extremo 5'. Tras el clonaje TA de estos fragmentos, la posterior digestión con BamHI/EcoRI y su purificación en gel de agarosa, fueron utilizados en una reacción de doble ligación con el plásmido PB-GFAP-EGFP previamente digerido, lo cual intercambió el EGFP por cada uno de los fluoróforos resultando en un plásmido de tipo PB-GFAP-XFP.

Con el fin de generar la forma nuclear de estos fluoróforos se clonó en la región 5' del mismo marco de lectura de los fluoróforos, la secuencia que codifica para la histona H2B humana (GenBank ID X00088.1). Esta secuencia fue amplificada por PCR a partir de DNA humano (purificado de células HEK). Para ello se usaron cebadores *forward* y *reverse* con un sitio BamHI (no homólogo a la secuencia molde) cerca de sus extremos 5'. Además el cebador *reverse* contenía la peculiaridad de sustituir el codón STOP TAA por el de la Alanina GCA, así como varias bases extra que permitían que el marco de lectura se continuase con el de los fluoróforos. Estas modificaciones estaban después (en dirección 5' → 3') del sitio BamHI. Como en los casos anteriores

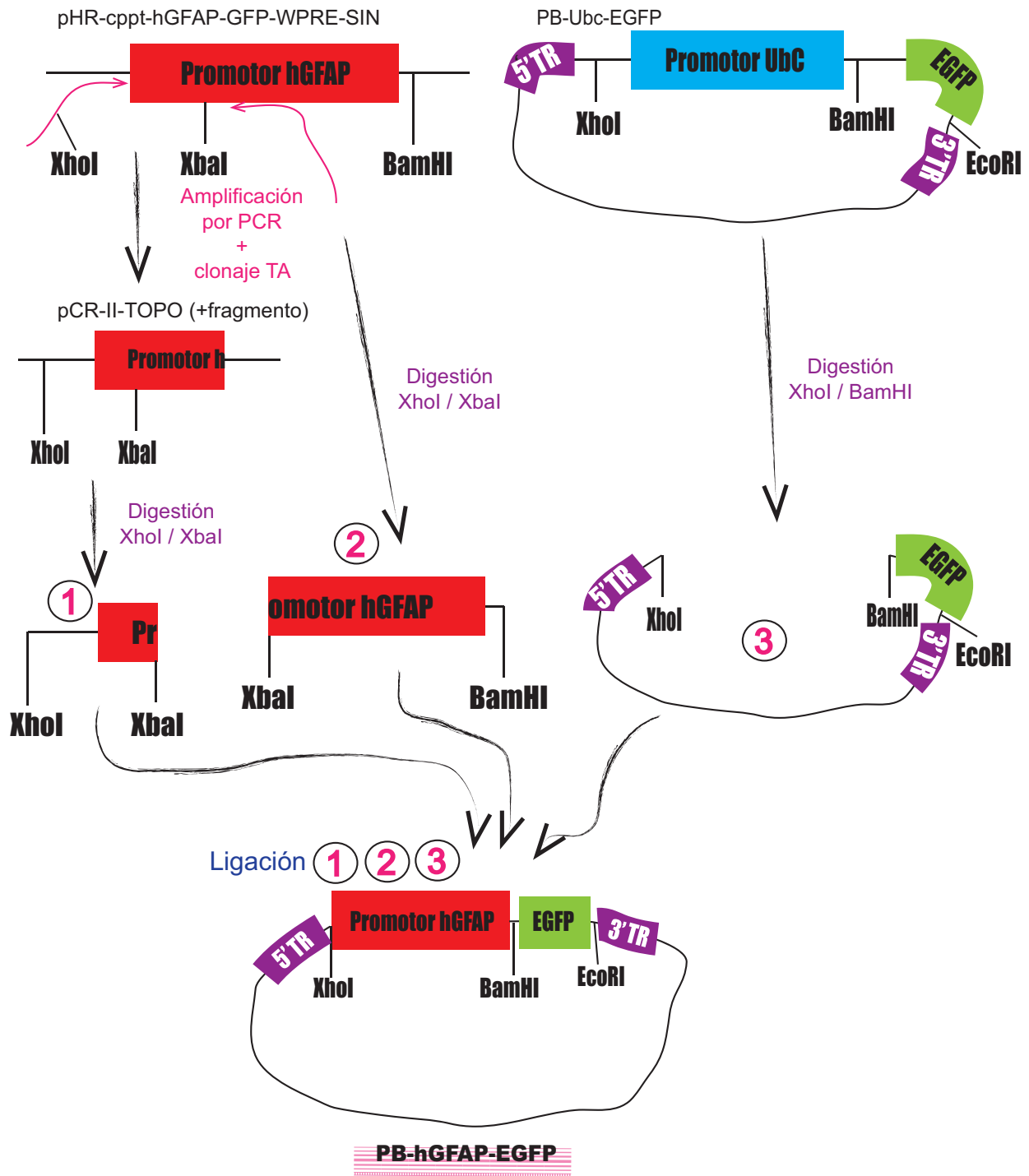
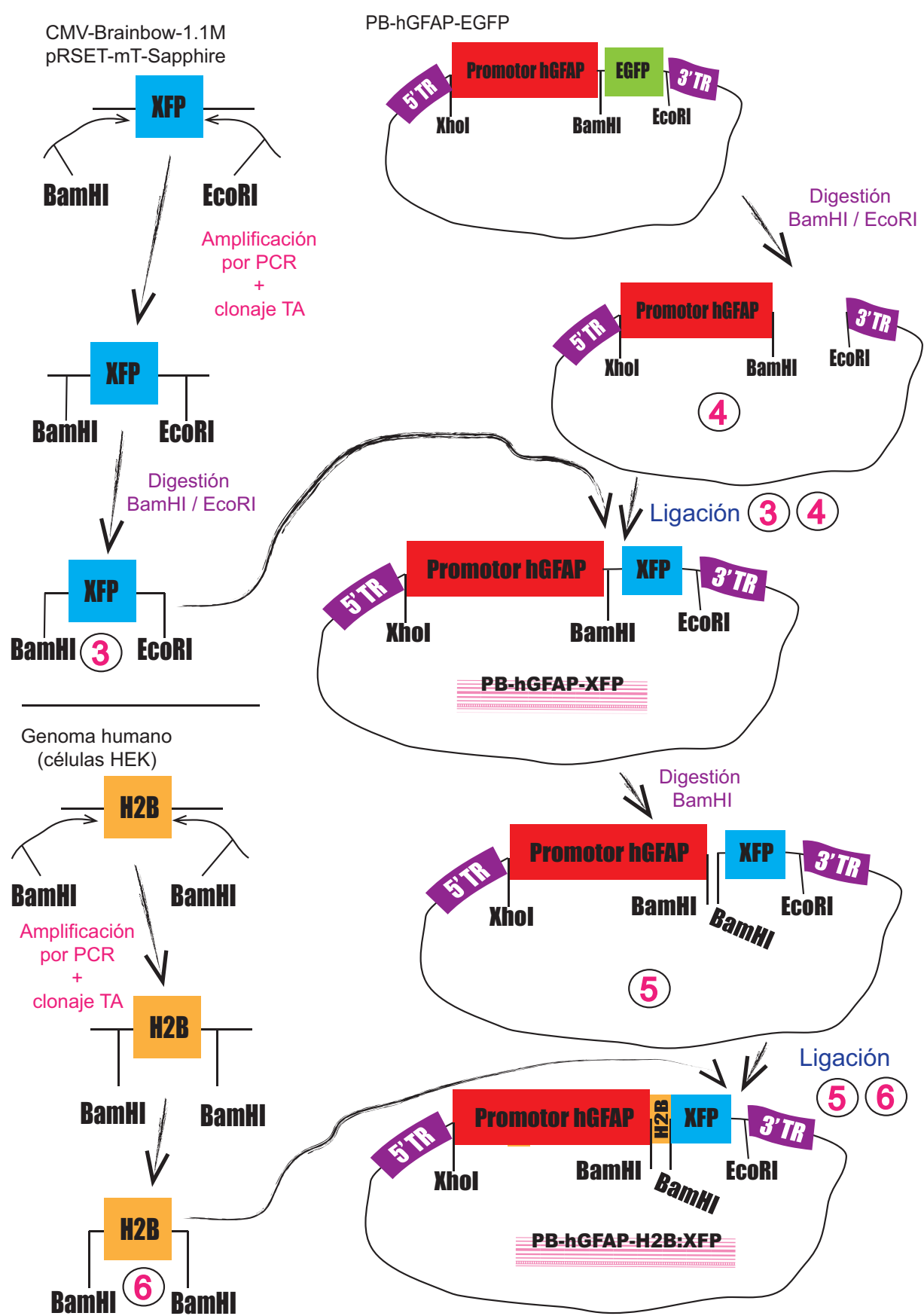


Figura 37. Estrategia de clonaje para la obtención de los distintos vectores. Esta estrategia se basa en la obtención del vector PB-hGFAP-EGFP a partir de los vectores con las repeticiones invertidas del Piggybac y el que contiene el promotor de hGFAP. Debido a que no encajaban las dianas de restricción, se optó por amplificar el promotor del hGFAP en dos pasos, introduciéndole una diana para XhoI antes de dicho promotor. Una vez obtenido ese plásmido, se utilizó primero para cambiar el EGFP por el resto de fluoróforos y después se clonó en cada uno de esos plásmidos, la secuencia codificante para la histona H2B:



este fragmento fue insertado en un vector pasarela por clonaje TA y después digerido con BamHI y purificado en gel de agarosa. Por otra parte, el vector PB-GFAP-XFP correspondiente a cada fluoróforo fue completamente digerido con BamHI,. En este caso la digestión fue fundamental ya que al no eliminarse ningún fragmento en la digestión, fue fácilmente confundible en el gel con la forma con la circular, que introduciría mucho ruido en la reacción de ligación. Después fue purificado en gel de agarosa (elimina parte de la posible contaminación con plásmido no digerido que migra algo más) y desfosfatado en sus extremos 5' (aquí este paso es esencial porque de lo contrario se recircularizaría el plásmido). Este tipo de clonaje tuvo dos posibles inconvenientes: por una parte requirió comprobar mayor número de colonias ya que el inserto podía integrarse en dos sentidos por utilizarse únicamente una diana de restricción y por otra parte que las bases extra podrían interferir en la función de la histona o del fluoróforo. Ambos problemas se solventaron, el primero comprobando el doble de colonias y el segundo porque se comprobó que esas bases extra no afectaron para nada en la fluorescencia de las formas nucleares de las distintas proteínas fluorescentes. Finalmente los fragmentos H2B se ligaron al vector previamente digerido y se comprobaron las colonias que lo habían insertado en el sentido correcto. Este plásmido se denominó PB-GFAP-H2B:XFP. Todos los plásmidos fueron finalmente secuenciados para asegurar la fidelidad de los clonajes.

VI. CIRUGÍA Y ELECTROPORACIONES DE PLÁSMIDOS INTRAÚTERO

La electroporación posibilita la introducción de ácidos nucleicos u otro tipo de moléculas en las células mediante la aplicación de un campo eléctrico, lo que provoca la desconfiguración de los lípidos de la membrana plasmática. Esto promueve la formación de poros que aumentan la permeabilidad de la membrana transitoriamente, permitiendo el paso de ciertas moléculas. Además el campo eléctrico también permite que las moléculas cargadas como el DNA migren en la dirección determinada por su polaridad. Esto parece contribuir a que penetre en las células, aunque los mecanismos implicados en la electrotransferencia de plásmidos son complejos y no están completamente caracterizados (Esoffre y cols. 2009).

En este procedimiento se utilizaron ratonas preñadas en estadio E13-E15. Una vez anestesiadas, se fijaron mediante cinta adhesiva en sus extremidades a una placa con control de temperatura y entrada de anestésico, tras lo que se les inyectó el analgésico y antibiótico y se les desinfectó la zona abdominal con alcohol de 70° y suero fisiológico (**Figura 38**). Mediante laparotomía se accedió a la cavidad abdominal y se expusieron los cuernos uterinos, manteniendo siempre que fue posible, la cavidad abdominal húmeda con suero fisiológico. Por transiluminación con luz fría se consiguió visualizar perfectamente la anatomía de los embriones. Una vez localizado el ventrículo de cada embrión, se inyectaron intraventricularmente 2 µl de la mezcla de plásmidos (equimolar para cada constructo, salvo el plásmido con la transposasa, del que se

puso el doble de cantidad que todos los demás juntos) a una concentración total de DNA de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Además se le añadió 1 μL del colorante Fast Green para facilitar la visualización de la mezcla.

Para la inyección se optó por un sistema de microinyección hidráulico al cual se le acopló una micropipeta de cristal de borosilicato sin filamento interno (World Precision Instruments Inc.). Esta micropipeta fue previamente cargada aplicando presión negativa con el émbolo del inyector, primero con aceite mineral (Sigma) y después con la mezcla de plásmidos. Fue decisivo que en este paso no se formasen burbujas ya que acumulan presión y enturbian el proceso de inyección.

Tras comprobar que el ventrículo de todos los embriones se coloreó de verde azulado por el Fast Green, se secaron con gasas estériles. Después se emplazaron dos electrodos de tipo pinza de 3 mm de diámetro (Sonidel), previamente impregnados con suero fisiológico, a cada lado de la cabeza y con el polo positivo en el lado del ventrículo por el que se había inyectado la solución. Esto permite que en el lado con más concentración de plásmido éste se mueva hacia el exterior, electroporándose entonces la pared lateral de los ventrículos laterales. Para electroporaciones en BO, los electrodos fueron emplazados en el eje caudo-rostral con el polo positivo en el lado rostral. Para aumentar la superficie electroporada, ésta orientación fue modificada ligeramente en algunos casos en los se aplicaron más de un tren de impulsos. Para una electroporación eficaz, fue esencial que el electrodo estuviese lo más cerca posible de los ventrículos coloreados por el Fast Green, sin interferir con la integridad del tejido. Una vez emplazados los electrodos se aplicó uno o dos trenes de cinco impulsos cuadrados de amplitud 33 V y duración 50 ms, con intervalos de 950 ms, para lo que se utilizó un generador de impulsos desarrollado por la Unidad de Apoyo Tecnológico a la Investigación (UATI) del Instituto Cajal.

Una vez electroporados los embriones, los cuernos uterinos se devolvieron a la cavidad abdominal y ésta se llenó con suero fisiológico. A continuación se cosió la pared muscular con sutura continua y la piel con sutura discontinua, ambas con un hilo quirúrgico de grosor 5.0. Finalmente se limpió la zona suturada con alcohol de 70° y se recuperó a la ratona como se explicó previamente (ver Anestesia y Analgesia).

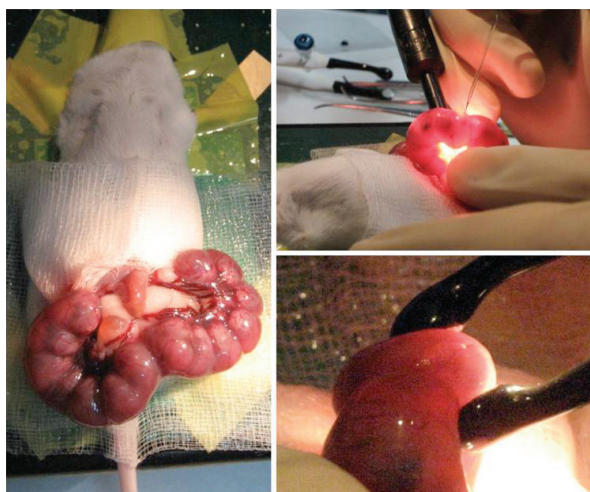


Figura 39. Técnica de cirugía y electroporación intraútero.

VII. ANÁLISIS DE DATOS

A. MICROSCOPIA

i. Microscopía de contraste de fases y epifluorescencia

Mientras el contraste de fases nos permitió observar por contraste las muestras de tejido y cultivos, la epifluorescencia fue fundamental para localizar la presencia de fluoróforos en los distintos tipos de muestras. Para ambos tipos de microscopía se utilizaron los mismos sistemas con distinta configuración:

-*Lupa de disección Leica MZFL-III*: Utilizado en la observación de cerebros completos a fin de comprobar la presencia de células electroporadas ya que, aunque las capas profundas no se pueden observar, hubo gran una correlación entre su presencia en capas superficiales con la presencia en capas más profundas. Esto ahorró mucho tiempo ya que evitó procesar tejido no electroporado correctamente. Los filtros utilizados fueron:

1.- Filtro GFP (excitación 470-540 nm; emisión 525-550 nm): para fluoróforos verdes y cercanos al verde.

2.- Filtro G (excitación 546-610 nm; emisión a partir de 590 nm): para ver fluoróforos que emiten en el rango del rojo visible.

- *Microscopio Nikon Eclipse E600, acoplado a una cámara digital Nikon DMX 1200F* Fue el dispositivo de elección para los experimentos que implicaban inmunomarcajes. Se utilizó el siguiente juego de filtros para epifluorescencia:

1.- Filtro Nikon UV-2A (excitación 330-380 nm; emisión a partir de 420 nm): para visualizar la contratinción de núcleos con Bisbenzimida.

2.- Filtro Nikon GFP(R)-BP (excitación 460-500 nm; emisión 510-560 nm): para el Alexa 488.

3.- Filtro Nikon G-2A (excitación: 510-560 nm; emisión a partir de 590 nm): para los Alexa 568, 594 y 633 (no es el recomendado para este Alexa pero permite observar si todo funcionó en la inmunotinción).

- *Microscopio Nikon Eclipse FI*: Sistema optimizado para electrofisiología con una plataforma adicional para portaobjetos. Debido a que posee un bloque de filtros personalizado para visualizar nuestros fluoróforos reporteros con el menor solapamiento posible, se utilizó para analizar las muestras de tejido previamente electroporado con la mezcla de plásmidos descrita anteriormente. Dicho bloque de filtros personalizados consta de los siguientes filtros:

1.- Filtro mCerulean (FF01-405/10)

2.- Filtro GFP (FF01-473/10)

3.- Filtro YFP (FF01-520/15)

4.- Filtro mKO (FF01-540/15)

5.- Filtro mCherry (FF01-590/20)

- *Microscopio invertido Leica AF 6500-7000*: Se utilizó acoplado a una cámara Andor DU8285 y el software específico LAS AF version: 1.5.1 build 869 (Leica). Debido a que es invertido y tiene un objetivo 10X de gran distancia de trabajo resultó muy útil para visualizar las muestras de cultivo directamente en las placas de plástico. Además dispone de un sistema de pletina motorizada que permitió tomar gran cantidad de imágenes de campos muy amplios de forma automática. Asimismo también lleva acoplado un sistema incubador que controla el CO₂ y la temperatura de la muestra, gracias a lo cual se llevaron a cabo los experimentos de time-lapse en cultivos. Este microscopio fue utilizado tanto en configuraciones de contraste de fase como de epifluorescencia. El juego de filtros (Leica) para fluorescencia fue el siguiente:

1.- Filtro A4 (excitación 360/40 nm; emisión 470/40 nm): para contratinciones con bisbenzimida.

2.- Filtro L5 (excitación 480/40 nm; emisión 527/30 nm): para el Alexa 488, GFP y YFP.

3.- Filtro N2.1 (excitación 515-560 nm; emisión a partir de 590 nm): para el Alexa 568/594, mKO y mCherry.

4.- Sistema de filtros dobles con Fast Filter Wheel IFW (Leica): permite cambiar entre CFP y YFP o GFP y mCherry de forma rápida y sin vibración.

- *Microscopio invertido Leica DMI 6000*: Acoplado a una cámara DFC350 Fx se utilizó de modo análogo al anterior salvo pero en experimentos de rutina sobre cultivos fijados y sin toma automática de imágenes. El bloque de filtros (Leica) que posee consiste en:

1.- Filtro A (excitación 340-380 nm; emisión a partir de 425 nm): para contratinciones con bisbenzimida.

2.- Filtro +GFP (excitación 470/40 nm; emisión 525/50 nm): para el Alexa 488, GFP y YFP.

3.- Filtro N2.1 (excitación 515-560 nm; emisión a partir de 590 nm): para el Alexa 568 y mKO.

4.- Filtro +TX2 (excitación 560/40 nm; emisión 645/75 nm): para el Alexa 594 y mCherry.

ii. Microscopía confocal

Utilizando iluminación puntual mediante láseres de distinta longitud de onda y un *pinhole* situado en un plano óptico conjugado en frente del detector, la microscopía confocal consigue eliminar toda aquella emisión de luz que no se encuentre en el plano focal, mejorando mucho la calidad de las imágenes. Además permite demostrar la colocalización de dos fluoróforos en

la misma célula ya que se puede recoger únicamente información de un solo plano de grosor definido. Por tanto fue el método elegido para el análisis final de muestras de tejido marcadas con fluoróforos.

El microscopio confocal utilizado fue un Leica TCS-SP5 de la Unidad de Imagen Científica y Microscopía del Instituto Cajal. Las adquisiciones con este confocal se hicieron mediante un escaneado secuencial de los distintos canales, cambiando a otro canal después de escanear cada plano. Los canales fueron los siguientes:

1.- Canal para el mCerulean/YFP/mKO: Excitación simultánea con las líneas de 458 y 514 nm recogiendo la emisión en los siguientes rangos: mCerulean 464-481 nm; YFP 520-543 nm; mKO 550-600 nm.

2.- Canal para el GFP/mCherry: Excitación simultánea con las líneas de 488 y 561 nm recogiendo la emisión en los siguientes rangos: GFP 496-526 nm; mCherry 601-612 nm.

3.- Canal para el mT-Sapphire y Alexa 633/Draq5™: Excitación simultánea con las líneas 405 y 633 nm y recogiendo la emisión en los siguientes rangos: mT-Sapphire 525-553 nm; Alexa 633/Draq5™ 649-760 nm.

En todos los casos la apertura del *pinhole* se mantuvo en el valor 1 AU (*Airy Units*) para mantener la confocalidad (obtención de la luz únicamente del plano focal). El valor de potenciómetro para el láser de Argón fue generalmente 25%. La frecuencia de escaneo se mantuvo en 400 Hz. Las imágenes fueron obtenidas en resolución 1024x1024 salvo que se indique lo contrario. La media de planos obtenidos para cada imagen fue de 2 a 4 en función del fondo de la muestra. Cuando se adquirieron varios planos en el eje Z (por definición el eje de profundidad de la muestra), el rango en este eje fue definido desde el plano más superficial al más profundo que contengan marcaje. El resto de parámetros como la intensidad del láser, la ganancia o la sustracción de fondo fueron establecidos aproximadamente para visualizar el mayor número posible de células sin que se saturaran aquellas de mayor intensidad de emisión.

A cada fluoróforo se le asignó un pseudocolor que correspondía al color de su emisión en el espectro visible, salvo para el mT-Sapphire al que se le asignó el azul oscuro debido a que emite en la misma región que el YFP.

B. ANÁLISIS *TIME-LAPSE* DE MUESTRAS DE CULTIVOS

En ambos casos el sistema *time-lapse* consistió en un microscopio invertido Leica AF 6500-7000 equipado con un sistema de incubación que mantuvo las muestras en un ambiente de humedad saturada, 5% de CO₂ y a 37 °C.

i. Co-cultivos de explantes de RMS y monocapas de astrocitos

Algunas muestras de los co-cultivos se analizaron mediante microscopía de contraste de fase tomando imágenes (con un objetivo 10X) cada 3 minutos durante un periodo de 6 horas previo

a la fijación. Estas horas correspondieron a las últimas 6 horas de un cultivo de 24 horas. Estas imágenes se adquirieron en al menos 4 posiciones de cada explante. En algunos casos los explantes fueron grabados durante las primeras 18 horas tras situar el explante, tomando imágenes cada 5 minutos (videos mostrados pero no incluidos en la estadística).

ii. Cultivos organotípicos de rodajas de cerebro

Todos los cultivos de rodajas fueron utilizados en este análisis. Las imágenes fueron adquiridas en configuración de epifluorescencia (objetivo 10X) con los filtros L5 (GFP y YFP) y N2.1 (mKO y mCherry). El intervalo de adquisición de imágenes fue de 40 minutos durante 48 horas. En estas condiciones no pareció existir una muerte significativa de células debida a la fluorescencia.

C. ANÁLISIS DE IMAGEN

Todas las imágenes obtenidas en este trabajo fueron modificadas únicamente en el brillo y contraste y estos ajustes se aplicaron a imágenes completas, mediante el software de imagen Adobe Photoshop CS3 y CS5. Los grupos de fotos tomadas en confocal correspondientes al mismo campo, fueron proyectados por proyección máxima utilizando el software ImageJ (NIH). De este modo se obtuvieron imágenes para cada canal y para cada campo que recogían información de todos los planos muestreados. Después los canales fueron combinados mediante Adobe Photoshop CS3 y CS5. Las imágenes correspondientes a experimentos de *time-lapse* fueron convertidas a vídeos por el software LAS AF version: 1.5.1 build 869 (Leica). Para hacer las reconstrucciones tridimensionales de las imágenes correspondientes a distintos planos focales de un mismo campo se utilizó el plugin 3D viewer de Image J. Cada plano estaba separado una distancia de 1 μm de los planos adyacentes.

Con el fin de medir áreas de migración en imágenes estáticas y finales de los co-cultivos se utilizó el programa ImageJ junto con el plugin Area Calculator . Para el seguimiento de las trayectorias de migración de las células en imágenes procedentes de los experimentos *time-lapse*, se usó el plugin para ImageJ Manual Tracking (Institut Curie). Los siguientes índices y valores fueron definidos para el análisis: a) Índice de migración, área total dividida por el área del explante; b) Desplazamiento máximo neto, distancia máxima cubierta por cada célula relativa al origen de migración; c) Trayectoria, longitud total recorrida desde el origen de migración a la posición final; d) Índice de serpenteo: trayectoria dividida por el desplazamiento máximo neto.

D. CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

i. Cuantificaciones de clones piales

Para analizar la composición clonal de astrocitos en la superficie pial se tomaron 24

secciones de 100 μm procedentes de seis animales adultos previamente electroporados en estadio E13-E15 y seleccionados aleatoriamente. En estas secciones se seleccionaron aquellos clones con células que distaban menos de 100 μm de la superficie pial en un eje imaginario, transversal al eje pial. Dentro de esos clones se cuantificó el número de células con morfología típica protoplásmica y el número de células con morfologías lamelares asociadas a la superficie pial (no se observaron otras morfologías). Para cada clon se estableció el porcentaje de las primeras respecto al total (porcentaje de pialidad). Después se calculó el porcentaje de clones o de células totales que presentaban un determinado porcentaje de pialidad en toda la población muestreada.

ii. Análisis estadístico

Para evaluar diferencias significativas entre tres o más grupos se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un test de Bonferroni para analizar diferencias entre cada grupo. En el caso del análisis comparativo de dos grupos se aplicó un test *T-student* para buscar diferencias significativas. En el caso del análisis de relaciones lineales entre parámetros, se usó un test de regresión lineal. Los resultados fueron confirmados en al menos tres experimentos independientes. La significancia estadística fue considerada con un valor-p menor de 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante la aplicación informática GraphPad Prims 5.0.

RESULTADOS

I. INFLUENCIA ASTROGLIAL EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS PROGENITORES DE INTERNEURONAS DE BO

A pesar del gran número de estudios describiendo diferencias entre poblaciones astrocitarias a distinto nivel, la implicación de esta heterogeneidad en la funcionalidad del cerebro es mucho menos clara. Con el fin de entender mejor qué implicaciones funcionales puede tener tal heterogeneidad astrocitaria, se eligió la generación de interneuronas de BO como paradigma debido a que ésta se produce acompañada por la presencia de varias poblaciones astrocitarias heterogéneas respecto a su morfología, bioquímica y funcionalidad.

Los neuroblastos progenitores de interneuronas de BO se generan, en la zona subventricular de los ventrículos laterales y mediante una migración primero tangencial y posteriormente radial, alcanzan las distintas capas del bulbo olfativo produciendo interneuronas granulares y periglomerulares. La íntima relación que existe entre esta migración y las distintas poblaciones astrogliales que conviven con esta migración nos hizo preguntarnos si de algún modo la heterogeneidad de estas poblaciones intervenía, influía o determinaba la migración de los progenitores de interneuronas de BO.

A. DEFINICIÓN DE LAS REGIONES CEREBRALES OBJETO DE ESTUDIO

En primer lugar se definieron las distintas regiones de interés relacionadas con la migración de precursores de interneuronas de BO (**Figura 40**):

i. Regiones permisivas para la migración

RMS: corresponde al camino migratorio de los neuroblastos. Se consideró únicamente la parte horizontal, desde el codo que hace al descender ventralmente hasta su entrada en el BO (sin incluir la región bulbar).

BO: supone el destino migratorio de las células, siendo algunas de sus capas también camino en la migración. Dentro del BO se descartaron las capas glomerulares y de los nervios olfativos, por la presencia de glía envolvente, que debido a que prolifera muy rápidamente en cultivo impediría obtener poblaciones astrocitarias puras, así como la capa subependimaria, por ser una zona de transición que podría contener elementos astrogliales mixtos entre BO y RMS.

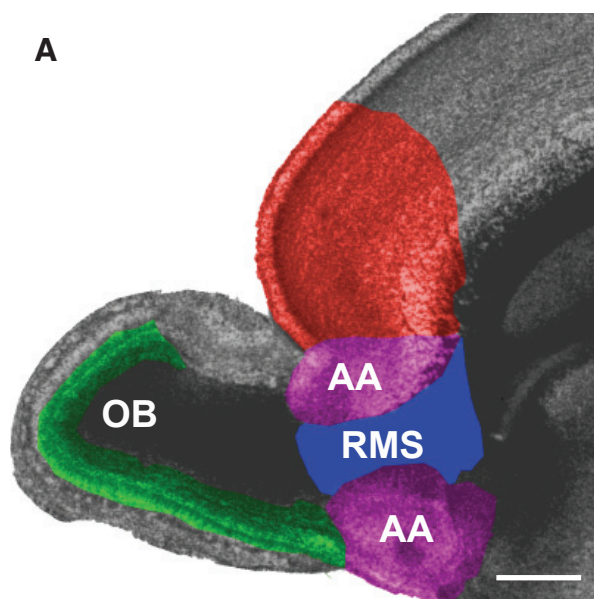


Figura 40. Regiones de tejido utilizadas para la obtención de los cultivos astrocitarios. Escala = 400 μ m.

ii. Regiones no permisivas para la migración

Corteza frontal: limita en muchas regiones con la RMS sin que los neuroblastos se desvíen significativamente de su migración. Además algunos experimentos de transplante de neuroblastos han demostrado que no migran eficazmente sobre corteza cerebral, al contrario que sobre otras regiones. Se analizaron únicamente aquellas zonas que van desde la parte más rostral hasta la aparición del cuerpo calloso más rostral.

Otras regiones adyacentes a la RMS: solo se incluyeron en algunos casos a fin de analizar otras regiones no permisivas que limitaban con la RMS. Estas regiones incluyeron tubérculo olfativo y núcleo olfativo anterior.

Las edades seleccionadas para el análisis estuvieron comprendidas entre P1 y P3, criterio basado en primer lugar en que el pico máximo de generación de interneuronas olfativas ocurre durante la primera semana postnatal, y en segundo lugar en que éstas edades permiten obtener cultivos confluentes de astrocitos, ya que por tratarse del pico de gliogénesis, existen numerosos progenitores gliales con capacidad proliferativa.

B. CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES ASTROGLIALES RELACIONADAS CON LA MIGRACIÓN DE PRECURSORES DE INTERNEURONAS DE BO

Con el fin de determinar algunas características sobre la abundancia y morfología de las poblaciones astrogliales en las distintas zonas, se llevaron a cabo marcajes inmunohistoquímicos para el marcador astroglial GFAP en ratones de edad P2/P5 (estadio temprano) y P15/P18 (estadio maduro). Mientras que en P2/P5 las poblaciones astrogliales comienzan a diferenciarse, en P15/P18 se puede tener una visión general sobre estas mismas poblaciones ya desarrolladas muy similar al de adulto (como en parte sucede, aunque no sea comparable, en los astrocitos tras cultivarlos durante dos semanas).

En estadio temprano existen claras diferencias morfológicas y de densidad de aquellas células que expresan la proteína GFAP entre las regiones descritas (**Figura 41**). En primer lugar, se observa una gran densidad de somas dispuestos alrededor del ventrículo lateral de los que emergen procesos de glía radial, que atraviesan el cuerpo calloso/sustancia blanca y el resto de capas corticales hasta alcanzar la limitante pial. Estas fibras de glía radial determinan los siguientes patrones de marcaje en Cx y RMS. Por un lado en la Cx la expresión de la proteína se produce fundamentalmente en empalizadas de fibras dispuestas radialmente e identificables como glía radial, así como en células astrocitarias de la limitante pial con procesos que recuerdan a astrocitos maduros. Asimismo es destacable la presencia de progenitores astrocitarios en las distintas capas corticales pero con morfología todavía no protoplásmica (**Figura 41E**). Este patrón de fibras radiales paralelas y regular cambia un poco a nivel de las capas profundas donde las fibras modifican muy ligeramente su dirección para volver a ser radiales y alcanzar la capa

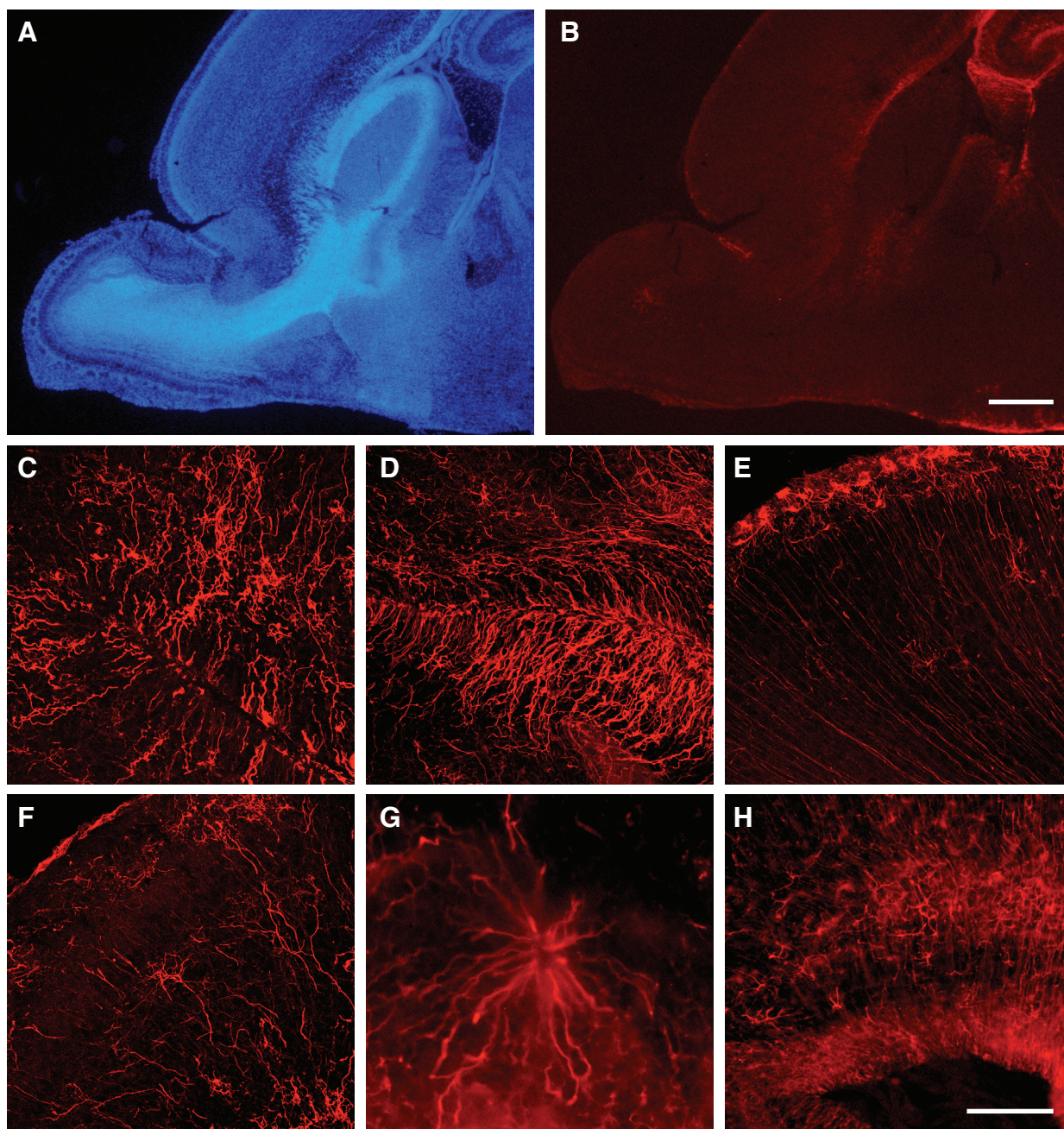


Figura 41. Poblaciones astrogiales relacionadas con la migración en un ratón P2/P5. A-B. Corte sagital que muestra la anatomía general del sistema SVZ/RMS/BO. En A el corte está teñido con un marcador nuclear fluorescente (bisbenzimidazole). En B-H, inmunomarcaje para GFAP. C. Región ventricular y subventricular del BO en corte sagital. D. Zona correspondiente a la parte más rostral de la RMS en corte sagital. E. Capas superiores de la corteza frontal en corte sagital. F. Capas superiores del BO en corte sagital. G. Tramo central de la RMS en corte transversal. H. Región cercana al ventrículo, que incluye zona subventricular y cuerpo calloso. En todos los casos, el perfil astrogial parece el de células de glía radial en su proceso de transformación y algunos progenitores astrogiales aislados. Edad P2 en C-F y P5 en A-B y G-H. Escala: A-B: 400 μ m; C-H: 50 μ m.

ventricular donde se localiza el soma (**Figura 41H**). En esta región irregular de las fibras, que incluye sustancia blanca/cuerpo calloso, se observan somas de otras células que presumiblemente corresponden a astrocitos maduros.

Debido a que hasta P4 no se oblitera el ventrículo olfativo, el cual se extiende desde los ventrículos laterales al BO, el patrón de marcaje en la RMS corresponde principalmente a las células de glía radial. Éstas tienen sus somas en la capa del ventrículo olfativo y proyectan sus procesos adaptándose a la anatomía de esta región. En secciones coronales se puede observar como los procesos de glía radial se extienden como los radios de una bicicleta (**Figura 41G**), mientras que en secciones sagitales los procesos se orientan de forma radial con una ligera orientación caudo-rostral desde la capa ventricular hasta el borde de la RMS (**Figura 41D**). Después transcurren paralelos a la RMS durante un pequeño trecho para cambiar de nuevo su dirección y buscar la dirección radial a la pia. Aparentemente la región dorsal se caracteriza por procesos más regulares y paralelos mientras que la región caudal exhibe procesos más irregulares (**Figuras 41D y G**). En ambos tipos de secciones, coronal y sagital, apenas se disciernen células astrocitarias o progenitores gliales con somas más allá del ventrículo y cuando lo hacen están presentes fuera de los límites de la RMS. Por tanto en este estadio la RMS es muy similar a la SVZ de los ventrículos laterales y de hecho desde un punto de vista anatómico la RMS no es más que la prolongación rostral de la SVZ.

A su vez, en el BO las células expresando GFAP se manifiestan también como fibras de glía radial que, al contrario que en la Cx, tienen un desarrollo mucho más irregular aunque también en el eje radial (**Figuras 41 C,E**). Sin embargo no se disponen los procesos de una forma paralela entre sí. Una vez en la capa glomerular éstas fibras se ramifican masivamente antes de llegar a la superficie pial, la cual también presenta un intenso marcaje. Asimismo, es obvia la presencia de algunos cuerpos celulares, sobre todo en las capas profundas del BO, que corresponden a astrocitos y progenitores astrocitarios.

Estos perfiles descritos en P2/P4 cambian radicalmente en P15/P18, adquiriendo un patrón casi idéntico al del adulto (**Figura 42**). En Cx las células GFAP positivas se distribuyen en lo que recuerda a un patrón difusivo, desde los ventrículos a la superficie pial, caracterizado por un intenso marcaje de células con morfología astrocitaria radial o estrellada en la VZ/SVZ y cuerpo calloso respectivamente (**Figura 42A, E, F**), y gradualmente menor hasta llegar a la superficie pial, donde la limitante glía aparece también intensamente marcada. Sin embargo gran parte de las capas corticales muestran un marcaje muy tenue o inexistente pero siempre de células con morfología astrocitaria (**Figura 42I, L**). Ya en esta edad se observan grandes vasos sanguíneos delineados por múltiples procesos astrocitarios (**Figura 42I**). De hecho gran parte del marcaje que se ve en las capas intermedias de la Cx se debe a astrocitos que rodean este tipo de vasos.

El tremendo marcaje que caracteriza la zona próxima a los ventrículos y el cuerpo calloso, se continua por la región de la RMS en la que ya no existe ventrículo olfativo, observándose en su lugar un gran número de procesos y somas astrocitarios en la región interna de la RMS (**Figura**

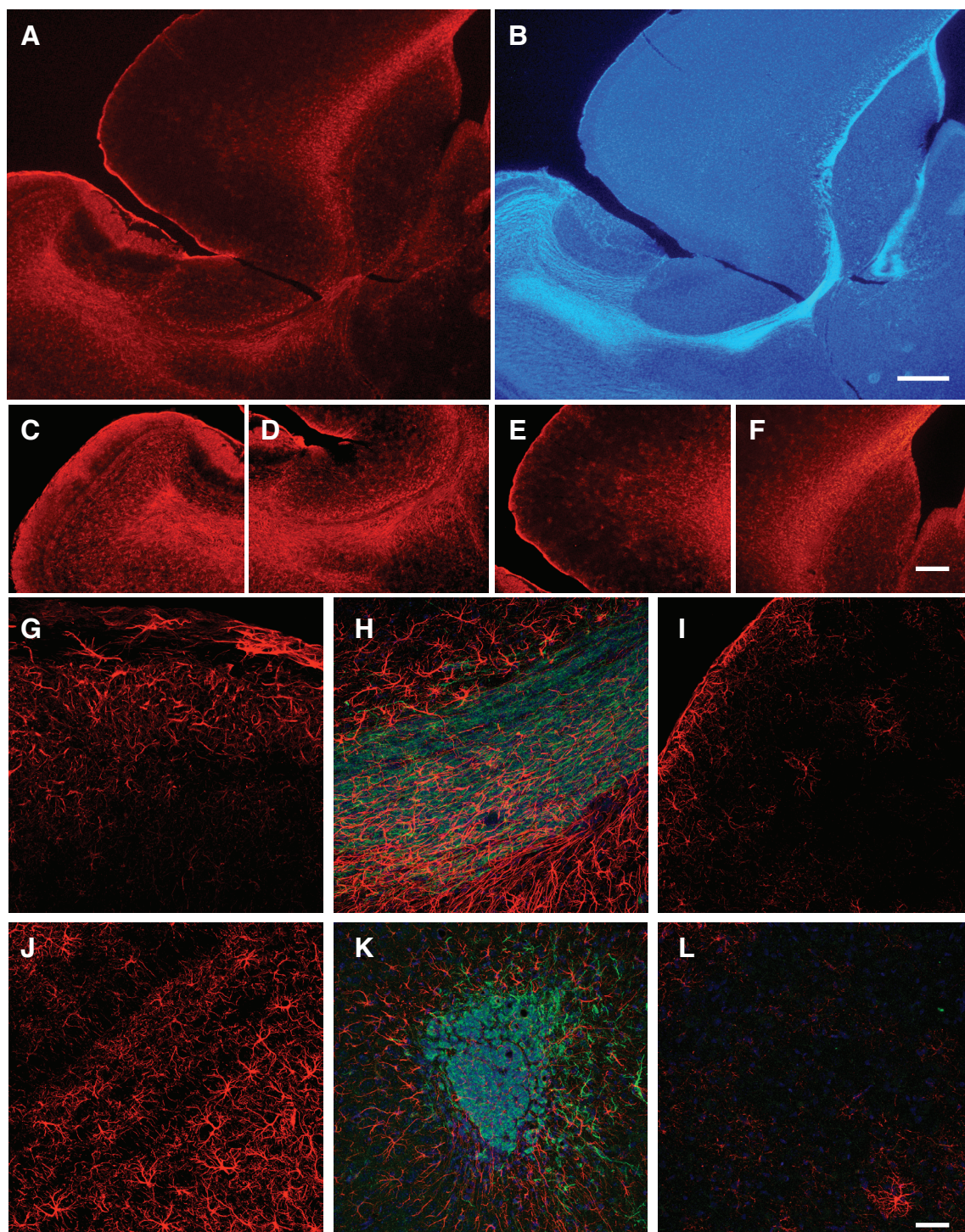


Figura 42. Poblaciones astrogliales relacionadas con la migración en P14/P18.
A-B. Cortes sagitales que muestran a baja magnificación el sistema SVZ/RMS/BO. **C-F.** Magnificaciones de C: BO; D: RMS; E: Cx; F: SVZ. **G.** Región de la ONL y GL del BO en corte sagital. **H.** Porción central de la RMS en corte sagital. **I:** Región de superficial de corteza en corte sagital. **J.** Capas granular y mitral de un corte sagital de BO. **K.** Corte transversal de la región central de la RMS. **L.** Capas II-IV de corteza. Salvo B, todas muestran marcaje para GFAP en rojo. En B se muestra tinción para el marcador nuclear bisbenzimidazole. En H y K además se muestra en verde inmunomarcaje para doblecortina, marcador de neuroblastos. Edades P14 en A-F y P18 en G-L. Escala: 400 μ m en A-B; 200 μ m en C-F; 50 μ m en G-L.

42D, H, K). Además se observa un patrón distinto entre la parte dorsal, con células más similares a astrocitos protoplásmicos y que delimitan perfectamente el camino migratorio, y la parte ventral, con haces de fibras de astrocitos/glía radial que marcan un borde difuso. Más ventralmente vuelven a aparecer astrocitos típicos. Este patrón es más claro en secciones coronales (**Figura 42K**), donde desde P14 en adelante se pueden ver procesos astrocitarios dentro del camino migratorio. Además, cuando la inmunotinción se hace también para doblecortina (que marca las cadenas de neuroblastos) se observa que esos procesos astrocitarios se disponen envolviendo estrechamente las cadenas migratorias.

Siguiendo el camino migratorio de la RMS, el intenso marcaje de GFAP es continuo hasta llegar al BO. De hecho el BO presenta una gran densidad de células intensamente marcadas aunque con un patrón distinto en función de las capas (**Figura 42C, G, J**). En la capa granular el marcaje es mucho menos denso aunque igual de intenso y corresponde a astrocitos protoplásmicos dispuestos homogéneamente en toda su extensión (**Figura 42J**). No obstante, este patrón se diferencia de otras estructuras como Cx en que aquí prácticamente todos los astrocitos parecen estar expresando GFAP. Por encima de esta capa, en las capas plexiforme externa y de células mitrales, el marcaje disminuye en densidad aunque se pueden distinguir claramente morfologías típicas de astrocitos (**Figura 42G**). Más superficialmente, en la capa glomerular, se retoma otra vez el marcaje muy denso y a pesar de que aquí las morfologías no son tan claras, se pueden discernir algunas morfología estrelladas. Por último, en la capa de nervios olfativos la densidad de células decae otra vez, salvo en la zona que limita con las meninges, donde se observa una tremenda densidad astrogliar con un marcaje mucho más intenso que en el resto de las capas y dispuesto de forma paralela a la superficie pial (**Figura 42I**). Asimismo, dispersos en las distintas capas bulbares se observan algunos procesos largos que recuerdan, aunque no por su orientación, a los procesos de glía radial y que podrían estar definiendo algún tipo de glía más inmadura. Este esquema de marcaje es bastante constante en las distintas regiones del BO.

C. CARACTERIZACIÓN DE LAS DISTINTAS POBLACIONES ASTROGLIALES EN LOS CULTIVOS EN MONOCAPA

Tras una breve caracterización de las distintas poblaciones astrogliales de las regiones definidas anteriormente, se cultivaron en monocapas cada una de las tres regiones, BO, RMS y Cx de cerebros de ratones P1 y P3. Las monocapas presentaban la apariencia de los cultivos de astrocitos clásicos, a pesar de partir de regiones tan restringidas. La gran mayoría de astrocitos encontrados correspondían al tipo 1, debido probablemente a la ausencia en estas regiones de tractos axonales importantes. Las distintas regiones proporcionaban mayor o menor número de células; mientras que tanto RMS (con una alta proliferación celular a pesar del poco tejido disponible) como Cx (por su gran cantidad de tejido disponible) permitían obtener grandes cantidades de astrocitos, los cultivos de BO siempre fueron limitantes por su baja proliferación (aparentemente similar a la

de Cx) y la escasa cantidad de tejido disponible. Afortunadamente la ausencia de células de glía envolvente justificó la no utilización de las capas glomerular y nerviosa aún a costa de la menor cantidad de tejido.

Con el fin de asegurar que las monocapas contenían una proporción suficiente de astrocitos, se llevó a cabo la inmunotinción de éstas con el anticuerpo para GFAP y se calculó el porcentaje total de astrocitos (**Figura 43**). En todas las regiones éste porcentaje fue mayor de un 91%, lo cual es similar a lo obtenido en otros trabajos siguiendo este método de cultivo. Además, fue muy importante el hecho de que no existieran diferencias significativas en este porcentaje entre las distintas regiones. Así pues el porcentaje fue de un 91,2 % para BO, 92,7 % para RMS y 92,5 % para monocapas de Cx, si bien hay que resaltar que además muchas de las células que no expresaban GFAP mostraban morfologías similares a los astrocitos de tipo 1, aunque probablemente la falta de expresión de GFAP sugería que se trataba de astrocitos inmaduros.

Las primeras inmunotinciones para GFAP revelaron claramente la distinta morfología astrocitaria entre las monocapas procedentes de distinta región (**Figura 44**). Así pues, mientras que los astrocitos de BO y RMS mostraron formas fusiformes bipolares, la apariencia de los astrocitos corticales fue más poligonal, con somas extensos y estrelladas, más similar a la descrita para astrocitos de tipo 1. Entre BO y RMS también existieron diferencias, estando las monocapas de RMS compuestas en su gran mayoría por células fusiformes bipolares, mientras que en BO estas mismas células aunque también abundantes, coexistieron con multitud de células de cuerpos celulares extensos. Además, estas mismas células con somas extensos fueron diferentes de las de Cx. Mientras que en Cx mostraron morfologías muy definidas y con numerosos procesos que les daban una apariencia estrellada, en BO estas células no poseían casi ningún proceso y tenían una forma mucho más difusa.

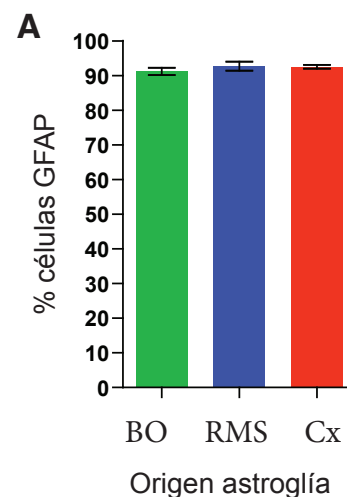


Figura 43. Porcentaje de células GFAP positivas en los cultivos. Las barras de error muestran el error estándar de la muestra.

D. INFLUENCIA DEL ORIGEN ASTROGLIAL EN LA MIGRACIÓN DE NEUROBLASTOS DE LA RMS

Las primeras descripciones de las monocapas astrogliales demostraron la existencia de algunas diferencias dependiendo del origen del que se obtuvo el tejido. Para analizar si existen diferencias en la influencia que puedan tener sobre la migración de neuroblastos de la RMS, se llevaron a cabo experimentos de co-cultivo entre explantes de RMS y las monocapas de los distintos orígenes. A priori, lo esperable era que las monocapas derivadas de zonas permisivas a la migración *in vivo*, soportasen mejor la migración que aquellas procedentes de zonas no permisivas. Inmunotinciones para Dcx y GFAP, revelaron una masiva

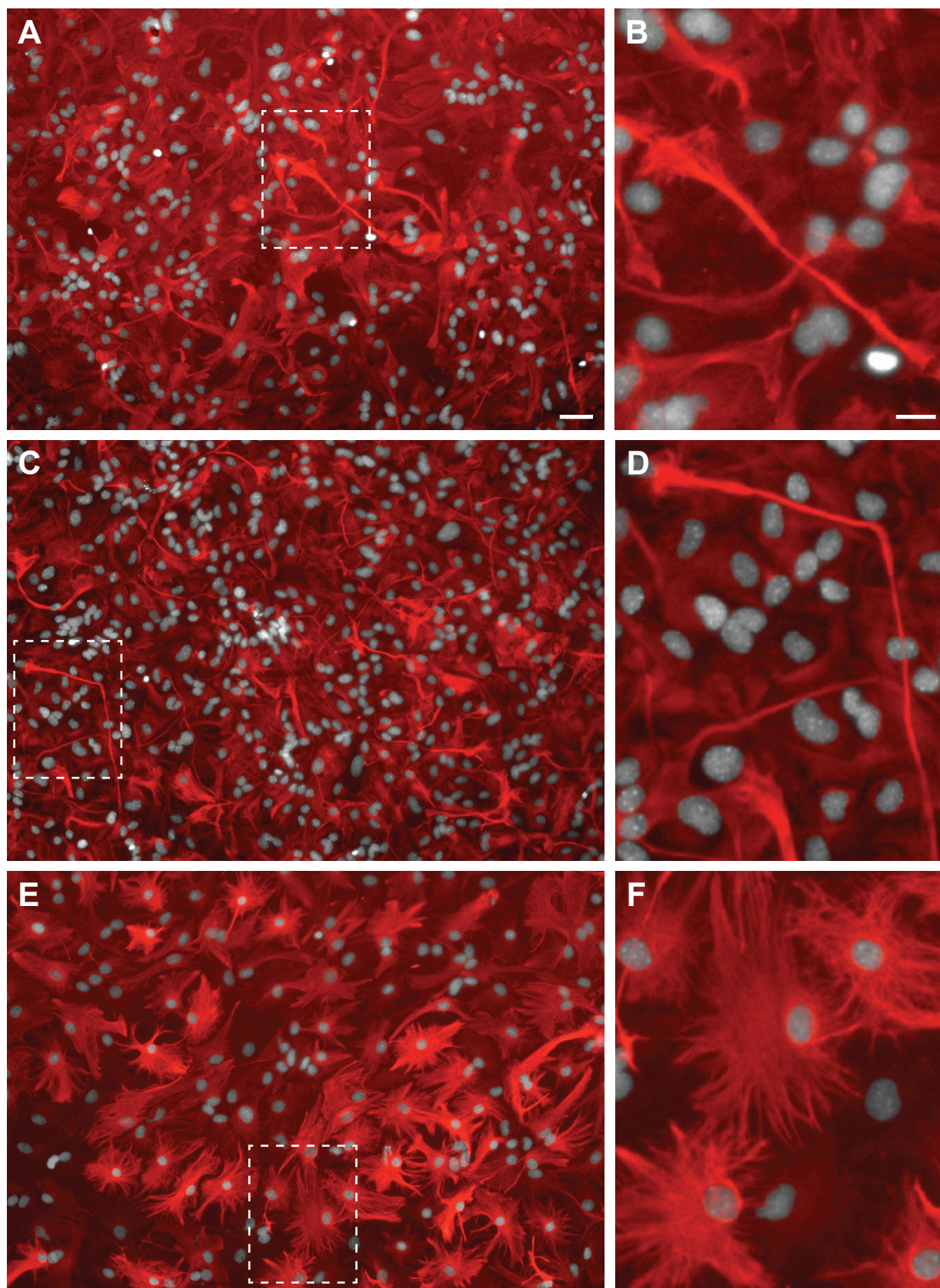


Figura 44. Morfologías en los cultivos astrogiales de distinto origen, inmunomarcaje para GFAP. A,B. BO. C,D. RMS. E,F. Cx. Escala = 50 μ m for A, C, E; 20 μ m para B, D, F.

migración de neuroblastos desde los explantes de RMS tras cultivarlos 1 DIV sobre las monocapas tanto de BO como de RMS. Por el contrario, esta migración fue muy reducida cuando dichos explantes se cultivaron sobre monocapas de astroglia de Cx. Para cuantificar este fenómeno se midió el índice de migración en los explantes, definido mediante la relación entre el área de migración y el área del explante. Este índice mostró diferencias significativas entre las distintas regiones permisivas y no permisivas (**Figura 45**). Mientras que en los cultivos sobre astroglia de BO y RMS el valor de éste índice fue de $12,44 \pm 1,26$ (media \pm error estándar) y $7,47 \pm 0,23$, el valor para explantes cultivados sobre astroglia cortical fue únicamente de $4,27 \pm 0,32$. Por tanto, este análisis demostró que la hipótesis era cierta y además reveló el inesperado resultado de que la astroglia de BO soporta más efectivamente la migración de estos neuroblastos que los astrocitos de la RMS.

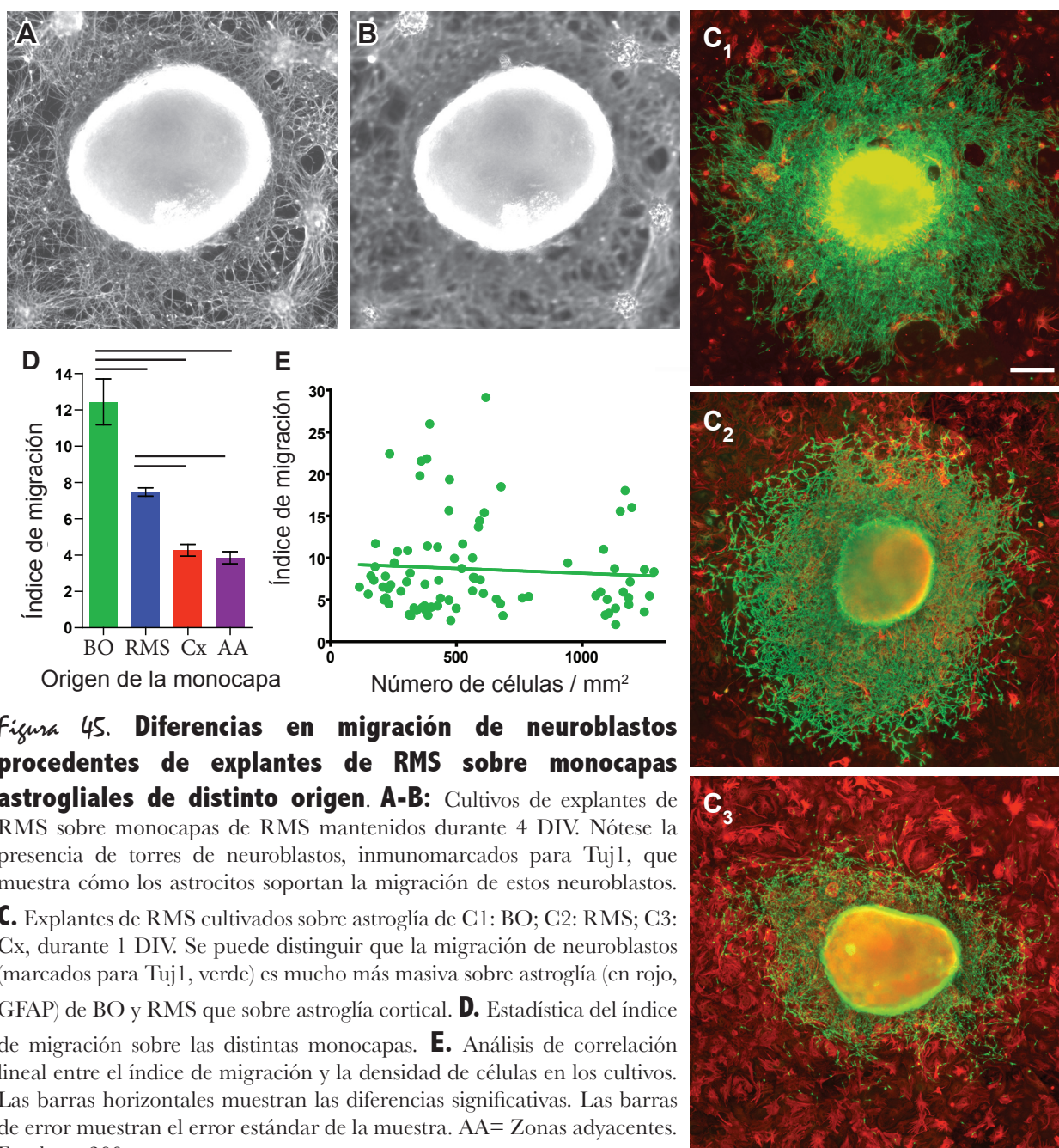


Figura 45. Diferencias en migración de neuroblastos procedentes de explantes de RMS sobre monocapas astrogliales de distinto origen. A-B: Cultivos de explantes de RMS sobre monocapas de RMS mantenidos durante 4 DIV. Nótese la presencia de torres de neuroblastos, inmunomarcados para Tuj1, que muestra cómo los astrocitos soportan la migración de estos neuroblastos.

C. Explantes de RMS cultivados sobre astroglia de C1: BO; C2: RMS; C3: Cx, durante 1 DIV. Se puede distinguir que la migración de neuroblastos (marcados para Tuj1, verde) es mucho más masiva sobre astroglia (en rojo, GFAP) de BO y RMS que sobre astroglia cortical. **D.** Estadística del índice de migración sobre las distintas monocapas. **E.** Análisis de correlación lineal entre el índice de migración y la densidad de células en los cultivos. Las barras horizontales muestran las diferencias significativas. Las barras de error muestran el error estándar de la muestra. AA= Zonas adyacentes. Escala = 200 μ m.

Durante el tiempo de formación de las monocapas, la distinta tasa de proliferación de cada tipo astrogliar produjo monocapas con distinta densidad celular. Para descartar que la densidad celular tenga algún tipo de influencia en la migración de los neuroblastos de la RMS, se llevó a cabo un análisis estadístico de correlación lineal entre el índice de migración y la densidad celular de la monocapa. Este análisis reflejó que no existía ningún tipo de correlación lineal entre ambos parámetros y a la vista de la nube de puntos de la gráfica (**Figura 45E**) también descartamos otro tipo de correlaciones.

El escaso soporte de la astrogliá cortical a la migración sugirió una importante función en la restricción *in vivo* del camino migratorio. A fin de demostrar que esto no era específico únicamente de la astrogliá cortical, se llevaron a cabo co-cultivos con una mezcla de otras regiones no permisivas adyacentes al camino migratorio (descritas anteriormente), revelando una migración muy reducida, con un valor medio del índice de migración de $3,86 \pm 0,33$. Además este índice no mostró diferencias significativas con aquel de astrocitos corticales, lo cual demostró que aparte de la cortical, la astrogliá de otras zonas no permisivas *in vivo* tampoco sostenía una migración masiva de neuroblastos *in vitro*.

E. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA DINÁMICA CELULAR ENTRE LAS DISTINTAS MONOCAPAS

Una vez demostrada la existencia de diferencias en el soporte de la migración por monocapas de distinto origen, quisimos conocer qué puntos exactos de la dinámica migratoria estaban determinando esas diferencias. Para ello se llevaron a cabo co-cultivos en los que mediante metodología *time-lapse* se analizó el curso migratorio de los neuroblastos. Para ello se tomaron imágenes de varias regiones en las que hubo migración, cada 3 minutos y durante un periodo de unas 6 horas correspondientes a las últimas de un cultivo de 24 horas totales. A partir de los videos se analizaron las trayectorias de 30 células aleatorias para cada origen, cuantificando diversos parámetros migratorios.

En concordancia con los resultados previos, la migración desde los explantes de RMS comenzó desde el principio a ser diferente (**Figura 46A-C**). Estas diferencias también se reflejaron en la extensión de las trayectorias de las células analizadas cuando se normalizaron sus orígenes para comenzar desde el mismo punto. Como se ve en la **Figura 46 (D-F)**, éstas trayectorias ocuparon una mayor extensión en el caso de explantes cultivados sobre BO, siendo esto aparentemente motivado por la presencia de un gran número de trayectorias rectilíneas que no implicaban muchos cambios de dirección o sentido. Estas trayectorias rectilíneas fueron menos evidentes en número y de menor longitud en los cultivos con astrogliá de RMS, en los que además existieron varias trayectorias que implicaban claros cambios de sentido. Pero fue en el caso de los explantes cultivados sobre astrogliá cortical en los que la extensión total de las trayectorias fue mucho menor y aparentemente con bordes más restringidos. Además, éstas trayectorias en las que las rectilíneas fueron una excepción y claramente más cortas en longitud, también se caracterizaron por numerosos giros y cambios de sentido.

El análisis preliminar de las trayectorias reveló que parecían gradualmente menores en longitud entre las distintas monocapas. Por esta razón, lo primero que hicimos fue utilizar la información de las trayectorias para comparar la velocidad media de las células durante el periodo completo (**Figura 46G**). Así pues, para BO la velocidad media fue de $72,4 \pm 2,93 \mu\text{m h}^{-1}$ (media \pm error estándar), para RMS de $64,40 \pm 3,7 \mu\text{m h}^{-1}$ y para Cx de $57,47 \pm 3,09 \mu\text{m h}^{-1}$. A pesar de que los datos muestran esta tendencia, totalmente acorde

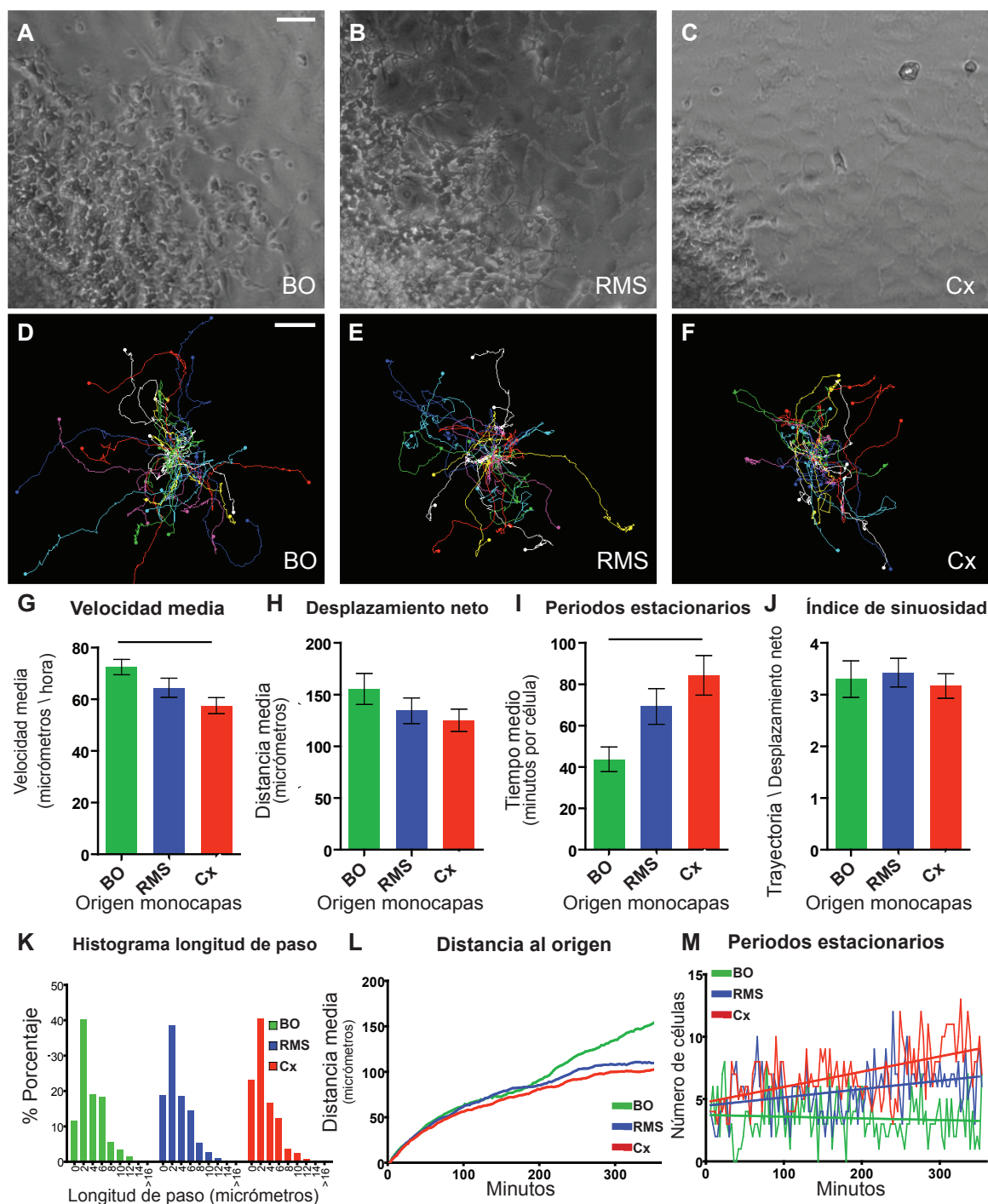


Figura 46. Análisis de la dinámica migratoria en co-cultivos de explantes de RMS y monocapas astrogliales. A-C. Migración de neuroblastos en monocapas astrogliales de A: BO; B: RMS; C: Cx. La extensión de la migración es mayor sobre astroglía de BO y RMS que sobre la cortical. D-F. Trayectorias de migración de células individuales durante 6 horas, ajustadas a un origen común. G. Velocidad media de migración. H. Media del desplazamiento neto máximo. I. Tiempo medio de duración de los periodos estacionarios por célula. J. Índice de sinuosidad. K. Histograma de la longitud de paso. L. Evolución de la distancia media al origen respecto al tiempo. M. Evolución del número de células paradas respecto al tiempo. Las líneas horizontales indican los grupos para los que hubo diferencias significativas. Las barras de error muestran error estándar. Escala = 50 μ m para A-C; 75 μ m para D-F.

con los resultados anteriores, el análisis estadístico solo encontró diferencias significativas entre BO y Cx.

Una mayor velocidad media de migración no conlleva necesariamente que las células ocupen mayor extensión en su migración, que es al fin y al cabo lo que refleja el índice de migración. Por esta razón, para tratar de entender las diferencias observadas en este parámetro, se midió también el desplazamiento neto máximo de cada (Figura 46H). Este parámetro refleja la distancia máxima que alcanza cada célula desde su origen. Así pues, la media de este parámetro para cada tipo de monocapa no mostró diferencias significativas ($p = 0,06$). Sin embargo, se repitió una tendencia que encaja perfectamente con los resultados anteriores y que sugiere que el desplazamiento neto individual de cada célula también puede estar detrás de las diferencias en migración.

La migración de neuroblastos progenitores de interneuronas de BO ocurre de un modo “saltatorio”, en el que el movimiento neto se genera alternando periodos de movimiento celular con periodos en los que la célula permanece parada (Bovetti y cols., 2007a; Wichterle y cols., 1997). Por tanto, el tiempo que cada célula permanece parada podría explicar tanto las diferencias encontradas en la velocidad media de migración como en última instancia las diferencias en el índice de migración. El análisis de dichos tiempos reveló que la media del tiempo de parada por célula fue de $43,7 \pm 5,9$ minutos (media \pm error estándar) en el caso del BO, $69,3 \pm 8,6$ para RMS y de $84,3 \pm 9,5$ para Cx (Figura 46I). Sin embargo, el análisis estadístico únicamente demostró diferencias significativas entre BO y Cx, si bien la tendencia volvió a encajar perfectamente con los datos previos.

Otro de los parámetros que contribuyen potencialmente a las diferencias en la extensión migratoria sobre las distintas monocapas es la tortuosidad de las trayectorias. A igualdad de velocidad media de migración, aquellas trayectorias con más cambios en dirección o sentido contribuirán en menor medida a la extensión migratoria que aquellas trayectorias rectilíneas. Para determinar este parámetro se definió un “índice de sinuosidad” como la relación entre la trayectoria y el desplazamiento neto máximo, de modo que un mayor índice reflejaría trayectorias más tortuosas. Este parámetro fue de $3,29 \pm 0,35$ (media \pm error estándar) en monocapas de BO, de $3,42 \pm 0,27$ en las de RMS y de $3,16 \pm 0,23$ para las corticales. Sin embargo, el análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los distintos grupos ($p=0,82$) y además en este caso la tendencia de los datos no correspondió con las diferencias en migración ya que se hubiera esperado que las monocapas de Cx tuvieran un mayor índice (Figura 46J).

Para complementar los análisis de la dinámica migratoria, se estudió la frecuencia de los movimientos en tiempos cortos. Para ello se definió un “paso” como la distancia migrada por una célula en un intervalo de 3 minutos (por tanto la distancia migrada por fotograma). La longitud media de cada paso se ordenó en un histograma que fue comparado entre los distintos grupos (Figura 46K). En todos los casos, este histograma mostró que los pasos más comunes fueron de $2 \mu\text{m}$ en todos los grupos y que además el porcentaje de este tipo de pasos fue similar en los distintos grupos. De hecho los histogramas fueron muy parecidos salvo por pequeñas diferencias acordes a los resultados anteriores en todos los tipos de paso. No obstante las mayores diferencias fueron en el número de pausas (definidos como aquellos pasos menores de $1 \mu\text{m}$). En este caso los histogramas reflejaron diferencias más importantes que encajaron perfectamente con los datos anteriores, particularmente con los de los tiempos de parada. Además, como se ve en los histogramas, la mecánica celular no varió cualitativamente en las distintas monocapas ya que en todos los casos se manifestaron los distintos tipos de paso, aunque en distinta proporción.

Todo el análisis de la mecánica migratoria descrito hasta ahora aglomera los distintos datos en el

tiempo total que dura el cultivo, obviando las posibles diferencias que se puedan producir a lo largo del tiempo total de cultivo. Para analizar si la dinámica de migración celular varió a lo largo del tiempo de cultivo, se analizó la distancia media de las células a su origen, lo cual refleja la dinámica de expansión celular. Como se puede observar en la **Figura 46L** esta distancia se incrementa linealmente durante los 50 primeros minutos de análisis, cambiando su pendiente ligeramente a partir de entonces. Las primeras diferencias entre los distintos grupos comienzan a aparecer a partir de los primeros 100 minutos de análisis y en el caso de la comparación RMS/Cx estas diferencias se mantendrán prácticamente constantes. Sin embargo, aproximadamente a los 200 minutos ocurre algo importante de cara a las diferencias entre RMS y Cx con BO. Mientras que tanto en las monocapas de RMS y Cx la media de la distancia al origen se satura y se estabiliza significativamente a partir de los 200 minutos, sobre las monocapas de BO sigue incrementándose de forma casi lineal, lo cual produce grandes diferencias finales entre BO y el resto de grupos.

Para intentar explicar estas diferencias entre la migración sobre monocapas de BO y de RMS/Cx, se analizaron el número de células paradas en cada momento en los tres grupos. Como se aprecia en la **Figura 46M**, la gran variación de este parámetro da a las representaciones un aspecto ruidoso. Así pues existe una tendencia de aumento del número de células paradas tanto en RMS como Cx. Esto no sucede en monocapas de BO donde la pendiente de la media se mantiene casi constante. Por tanto, estos datos sugieren que un incremento de los tiempos de parada de las células tanto en RMS como Cx contribuyen también a las diferencias en los índices de migración. En resumen, considerando la tendencia de los datos, el aumento en los tiempos de parada podría estar contribuyendo a una menor velocidad media de migración y a un menor desplazamiento neto máximo a nivel de célula individual. Esto sin duda actúa determinando las diferencias en índices de migración observadas para las distintas monocapas.

F. NATURALEZA DE LOS FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LAS DIFERENCIAS MIGRATORIAS

Basándonos en que las monocapas astrogiales de distinto origen sostienen la migración con distinta eficacia, lo siguiente que nos planteamos fue la naturaleza de los factores moleculares que median dichas diferencias. En una primera aproximación nos propusimos estudiar si se trataba de factores difusibles o asociados de algún modo a la membrana de las células (de contacto). Para ello llevamos a cabo dos tipos de experimentos de co-cultivo complementarios.

i. Co-cultivos dobles de tipo contacto

Se llevaron a cabo co-cultivos en los que el medio soluble fue el mismo para dos monocapas de distinto origen que soportaban cada una la migración desde explantes de RMS. Esto se consiguió produciendo dos monocapas de distinto origen en un mismo pocillo. Ambas monocapas estuvieron separadas por una banda sin células, la cual permitió distinguirlas y en cada una de las dos monocapas de distinto origen se cultivó un explante de RMS, de modo que cada explante tenía acceso al mismo medio soluble (conteniendo factores solubles de ambas monocapas) pero a distintos factores no difusibles de contacto (**Figura 47A-B**). Para comprobar si no hubo mezcla de células, se hizo una prueba en la cual se utilizó una monocapa obtenida a partir de tejido de un ratón expresando GFP ubicuamente (bajo promotor de la β -actina), en

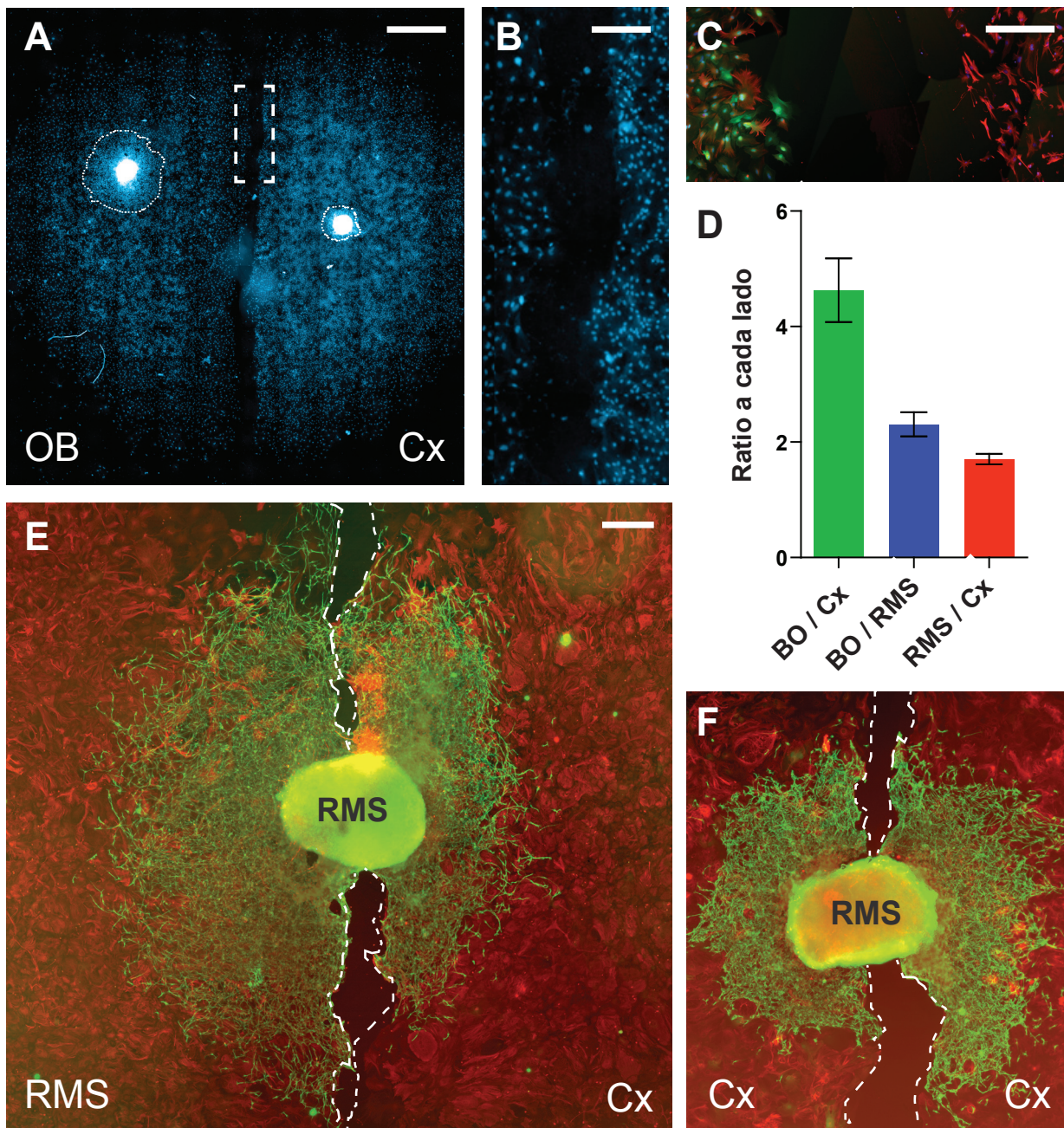


Figura 47. Co-cultivos en condiciones de contacto entre explantes de RMS y monocapas de distinto origen en el mismo pocillo. **A.** Baja magnificación de un cultivo teñido con el marcador nuclear bisbenzimidá. Esta imagen muestra un pocillo en el que existen dos monocapas, una de origen bulbar y otra cortical, cada una de las cuales soporta la migración desde un explante de RMS. **B.** Ampliación de la figura anterior mostrando la ausencia de células en la banda entre ambas monocapas. **C.** Inmunotinción para GFAP de una prueba de este tipo de cultivos pero con una de las monocapas procedente de un animal expresando GFP ubicuamente. Nótese la ausencia de células verdes tanto en la banda sin células como en la otra monocapa. **D.** Ratio entre el índice de migración a cada lado. **E-F.** Cultivo, inmunomarcado para GFAP y Tuj1 en el que el explante fue puesto entre ambas monocapas. Escala = 1,5 mm en A; 300 μ m en B; 100 μ m en C; 200 μ m en E-F.

cuyo caso no vimos mezcla celular entre ambas monocapas (**Figura 47C**).

Si los factores de contacto fueran suficientes para marcar las diferencias en migración se esperaría que la migración en cada lado conteniendo monocapas de distinto origen fuese distinta. Esto se reflejaría en que el ratio del índice de migración a cada lado fuera distinto de 1. Así pues, se midió el índice de migración de los explantes a cada lado en co-cultivos de este tipo que recogían las distintas combinaciones: BO/Cx, RMS/BO y Cx/RMS. La media de este ratio para co-cultivos tipo BO/Cx fue de $4,63 \pm 0,55$ (media del ratio \pm error estándar), lo cual manifestó que los explantes de RMS migraban en torno a cuatro veces más sobre monocapas de BO que sobre las de Cx incluso cuando compartían el medio soluble. Este valor para RMS/BO fue de $2,31 \pm 0,21$ y para Cx/RMS de $1,71 \pm 0,09$ (**Figura 47D**). Debido a que este valor fue mayor que 1 en todos los casos, esto demuestra que los factores de contacto asociados a la astrogliá son suficientes para promover las diferencias en el soporte de la migración evidenciadas entre las monocapas de distintos orígenes. Además, estas diferencias se mantuvieron incluso en cultivos similares en los que el explante fue situado en la interfase entre monocapas de RMS y Cx (**Figura 47E**) pero no en el caso de que ambas monocapas fueron corticales (**Figura 47F**). Estos datos confirman los resultados anteriores y descartan que las diferencias fuesen mediadas por factores difusibles a cortas distancias.

ii. Co-cultivos de tipo no-contacto

Como hemos visto, los factores de contacto son suficientes para explicar las diferencias en la migración de neuroblastos sobre las distintas monocapas astrogliales. Aún así podrían existir factores solubles que contribuyan en uno u otro sentido a la influencia de las monocapas en la migración. Con el fin de comprobar la posible existencia de este tipo de factores, se llevaron a cabo co-cultivos de explantes de RMS en condiciones que impidieran el contacto entre astrocitos y neuroblastos. Debido a que el soporte de los astrocitos es fundamental para que se produzca la migración de neuroblastos, se utilizó una matriz de colágeno para sustituir dicho sustrato astrocitario. Este tipo de cultivos

en colágeno han sido ampliamente utilizados y debido a que está compuesto básicamente por colágeno tipo I, proporcionan lo mínimo necesario para la migración pero sin aportar otros factores definidos o indefinidos. Además, para asegurarnos que ningún tipo de contacto se producía por la invasión astrocitaria del colágeno o por la migración de los neuroblastos fuera del colágeno, los explantes, incluidos en matrices de colágeno, fueron acoplados a soportes formados por un cubre de circular de cultivo con tres apoyos de parafina (**ver Figura 30**). De este modo los explantes recibieron el aporte de los factores solubles de los astrocitos dado que la matriz de colágeno deja

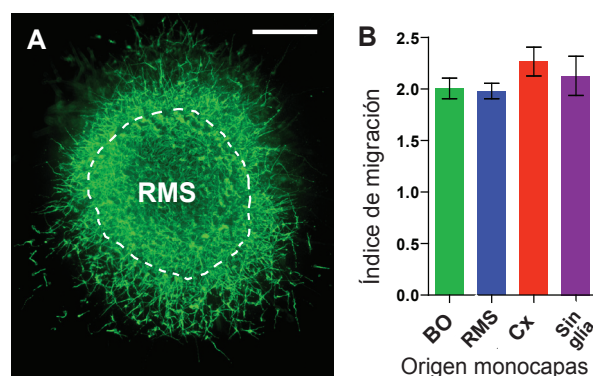


Figura 48. Co-cultivos sin contacto entre explantes de RMS en matrices de colágeno y monocapas astrogliales de distinto origen.

A. Explante de RMS y migración de neuroblastos marcados con Tuj1. B. Índice de migración para las distintas monocapas o en ausencia de monocapa. Escala = 100 μm.

poros de un tamaño en el orden de micras (Yang y cols., 2010).

Debido a que la migración es mucho menos eficiente en matrices de colágeno que sobre astrocitos, los co-cultivos se dejaron 4 DIV. Tras este tiempo el índice de migración de los explantes de RMS no mostró diferencias significativas entre las distintas monocapas (**Figura 48A-B**). Así pues, incluso en ausencia de la monocapa glial, tampoco existieron diferencias significativas respecto a los co-cultivos con glía. Esto confirmó que los factores solubles no jugaron ningún papel importante en las diferencias de migración promovidas por la astroglía de las distintas regiones.

G. EXPRESIÓN DE GENES DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR

Los resultados anteriores confirmaron que las diferencias de migración de los explantes de RMS sobre monocapas astrogliales de distinto origen están mediadas por factores de contacto. La implicación de factores de contacto en la migración como proteínas de adhesión y matriz extracelular ha sido ampliamente descrita. A fin de analizar la expresión de este tipo de factores moleculares en las monocapas de distinto origen, se llevó a cabo un análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa a partir de RNA de los tres tipos de monocapas. Este análisis reveló importantes diferencias en la presencia de estos genes como se resume en la **Figura 49**. De hecho, el perfil de expresión mostró que tanto la astroglía de BO como RMS expresan en mayores cantidades la mayoría de estos genes, cuando se compara con aquella de Cx. De los 18 genes cuya expresión difirió significativamente entre BO y Cx, las monocapas de BO mostraban mayor expresión en 16 de ellos (**Figura 49A**). Entre RMS y Cx ocurrió algo similar ya que la astroglía de RMS tuvo mayor expresión en 24 de 27 genes (**Figura 49B**). No obstante, esta diferencia en expresión fue mucho más discreta cuando se compararon los grupos de BO y RMS, ya que las monocapas de BO tuvieron mayor expresión en 6 genes y las de RMS en 12 genes (**Figura 49C**). Por tanto, desde un plano general estos datos demuestran que tanto la astroglía de BO como la de RMS está caracterizada por la mayor expresión de genes de adhesión y matriz extracelular, en comparación con la astroglía procedente de regiones corticales. Esto además sugiere que esta propensión a la mayor expresión de este tipo de genes, podría reflejar el establecimiento de un ambiente muy propenso para la migración.

Un análisis más exhaustivo de los perfiles de expresión de los genes de adhesión y matriz extracelular nos permitió conocer qué factores concretos aparecieron diferencialmente expresados en los distintos tipos de monocapa. Así pues, clasificamos los distintos factores en base a su expresión relativa como altamente expresados (con expresión relativa por encima de 5×10^{-7} UA), de expresión media (entre 5×10^{-7} y 2×10^{-8} UA) y de baja expresión (expresión menor de 2×10^{-8} UA; **Figura 49E-G**). Entre los genes altamente expresados destacaron, por sus importantes diferencias de expresión, tanto *Thbs1* (11,7 veces más expresado en astroglía de BO que en la de Cx y 6,41 veces más expresado en la de RMS que en la de Cx) como *Colla1* (10,1 veces más

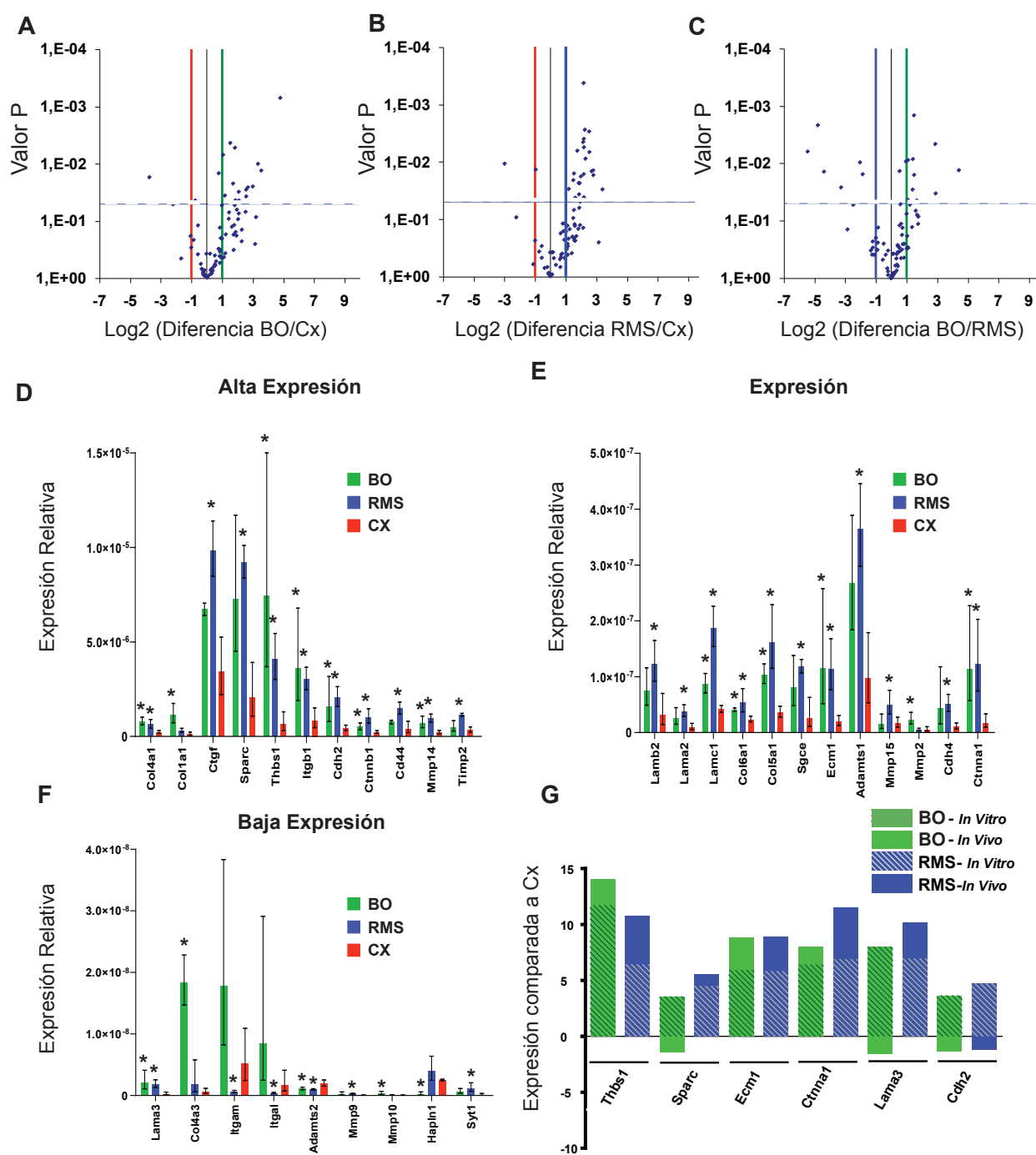


Figura 49. Análisis de expresión génica de genes de ECM y adhesión celular en monocapas de distinto origen. A-C. Gráficos mostrando el valor P y las diferencias para cada gen comparando A: BO/Cx; B: RMS/Cx; C: RMS/BO. **D-F.** Expresión relativa para genes de D: Alta expresión; E: Expresión media; F: Baja expresión. Los asteriscos señalan diferencias significativas en la expresión respecto a los astrocitos corticales. **G.** Gráfico que muestra la relación entre la expresión *in vivo* e *in vitro* para algunos genes seleccionados. Las barras muestran el rango de los datos.

expresado en las monocapas de BO que en las de Cx). Respecto a los genes de expresión media cabe destacar *Ctnna1* (6,38 veces más expresado en astroglia de BO y 6,88 veces en astroglia de RMS en comparación con las monocapas corticales) y *ECM1* (5,91 veces más expresado en BO y 5,8 en RMS comparado con las monocapas corticales). Por último, fue precisamente en los genes con menor expresión donde se encontraron aquellos más presentes comparativamente en las monocapas corticales. Este fue el caso de *Adamts2* (1,71 veces más expresado en Cx respecto a BO y 1,96 veces respecto a Cx), *Itgam* (8 veces más expresado en Cx que en RMS) o *Hapln-1* (13,6 veces más expresado en Cx que en BO) .

Si alguno de estos factores *in vivo* fuera fundamental para marcar la permisividad del tejido, sería de esperar que a pesar de la existencia de otras células que distorsionen sus niveles de expresión, existirían diferencias en la línea de las encontradas en los cultivos. En un intento de buscar posibles factores que pudieran estar actuando también *in vivo*, llevamos a cabo el análisis de expresión en tejido de algunos de los genes más interesantes encontrados *in vitro* (**Figura 49G**). Para ello se aislaron muestras de RNA a partir de tejido de las distintas regiones de ratones P2. Como era de esperar, se encontraron diferencias comparables a *in vitro* en algunos de estos genes pero no en todos. Así pues, *Thbs-1* y *Ecm1* también estuvieron más expresados en muestras de BO y RMS respecto a Cx, mientras que *Ctnna1* y *Lama3* se expresaban mas en RMS que Cx pero no en BO en comparación con las de Cx como sucede en cultivo. Por último, y a diferencia de los resultados *in vitro*, *Sparc* y *Cdh2* no se expresaron más en BO y RMS respecto a Cx aunque sus niveles de expresión relativa fueron del mismo orden *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que *Thbs-1* y *Ecm1* están posiblemente implicados en dictar las diferencias de permisividad tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque faltan otros estudios de pérdida de función que pudieran aclarar si eso es así.

II. CONTRIBUCIÓN DEL DESARROLLO A LA GENERACIÓN DE HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA

Como ha sido descrito anteriormente, las poblaciones astrogliales componen poblaciones heterogéneas que desempeñan distintas funciones. Esta heterogeneidad, que se manifiesta a distintos niveles del fenotipo celular, está indudablemente determinada por factores extrínsecos e intrínsecos (a las células) bastante desconocidos. Sin embargo, mientras que los factores extrínsecos han sido algo más estudiados, el papel de los factores intrínsecos en la determinación de heterogeneidad entre poblaciones astrocitarias es prácticamente desconocido.

Una de las mejores aproximaciones para estudiar el papel de los factores intrínsecos consiste en considerar aquellas poblaciones astrocitarias con las mayores similitudes posibles derivadas de su ontogenia, esto es, catalogando a las células en función del progenitor del que proceden. De esta forma, el análisis de las diferencias y similitudes entre células hermanas y no hermanas expuestas a distintos ambientes revelará qué rasgos fenotípicos no están determinados por el ambiente sino por factores intrínsecos derivados del desarrollo. Desgraciadamente, la ausencia

de técnicas precisas y efectivas de análisis clonal *in vivo* hizo necesaria la generación de una nueva herramienta de este tipo.

A. STAR TRACK: UNA NUEVA HERRAMIENTA DE ANÁLISIS CLONAL DE ASTROCITOS *IN VIVO*

Motivados por la ausencia de herramientas de análisis clonal *in vivo* y debido a la importancia que podrían tener en el esclarecimiento de los mecanismos intrínsecos de la heterogeneidad, decidimos generar un método que denominamos Star Track (en castellano, trazado de los astros), basado en la generación de marcas específicas rastreables y heredadas por todas las células que componen un linaje (**Figura 50**).

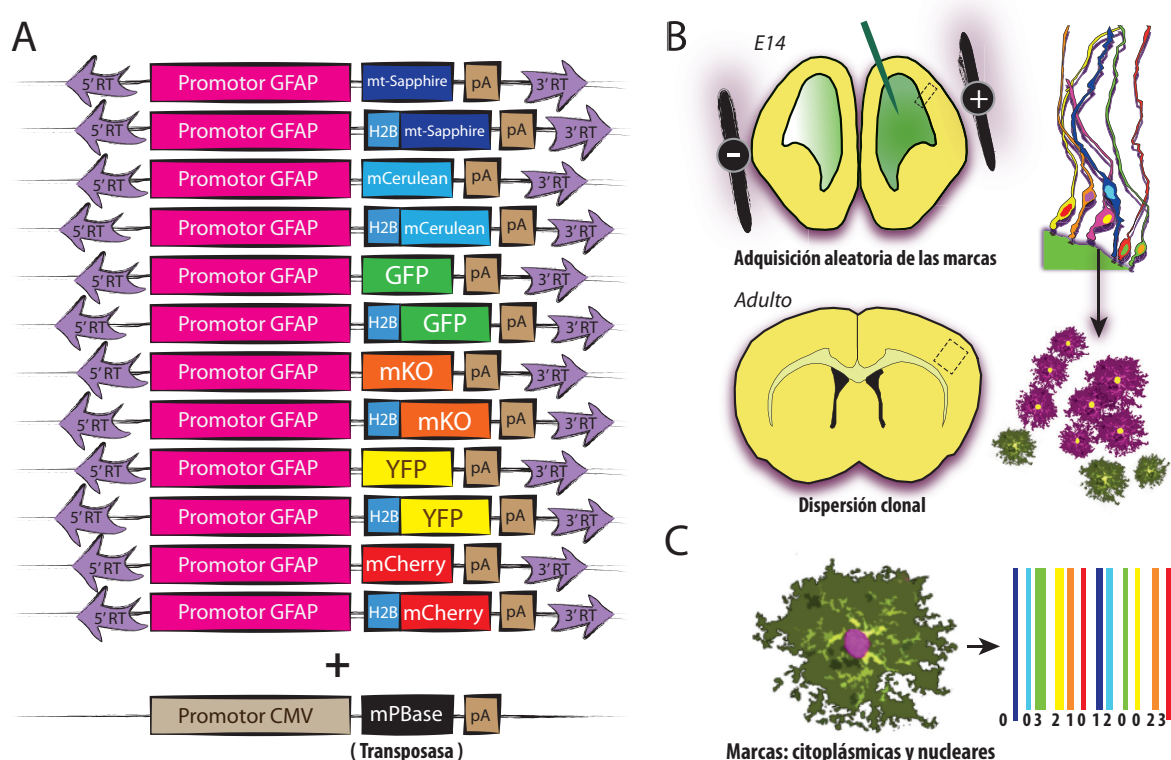


Figura 50. Esquema del sistema de análisis clonal Star Track. A. Mezcla de los plásmidos utilizados.

B. Las electroporaciones en el ventrículo de embriones E14 permiten introducir la mezcla de plásmidos en los progenitores, donde se generará una marca específica y heredable por toda la progenie. Esto genera clones de astrocitos hermanos reconocibles por compartir la misma marca fluorescente. **C.** Las marcas fluorescentes en citoplasma y núcleo funcionan de este modo como un código de barras celular.

Para la generación de dichas marcas específicas utilizamos distintas proteínas fluorescentes con espectros parcialmente separables (**Figura 51**). Una combinación específica de proteínas fluorescentes distinguibles expresadas a una concentración determinada conseguiría, al menos teóricamente, la producción de suficientes marcas específicas de cada célula y rastreables en el cerebro. Por tanto, basándonos en sus propiedades bioquímicas y funcionales, se eligieron seis proteínas fluorescentes que cubrieran la mayor

Proteína	Máximo Excitación	Máximo Emisión	Estado de Oligomerización
mT-Sapphire	399	511	Monómero
m-Cerulean	433	475	Monomero
EGFP	488	507	Dímero débil
EYFP	514	527	Dímero débil
m-Kusabira	548	559	Monómero
Orange			
m-Cherry	587	610	Monómero

Figura 51. Tabla con las propiedades de las distintas proteínas fluorescentes utilizadas.

parte del espectro visible. Entre estas propiedades fue imprescindible que fuesen muy brillantes, con baja toxicidad para las células, que no experimentasen *photobleaching* (pérdida de fluorescencia por acción de la luz) y que se expresasen a niveles suficientemente altos en las células. De este modo, las proteínas fluorescentes clásicas escogidas fueron mCerulean, EGFP, YFP, mKO y mCherry. En un intento de explotar algunas regiones del espectro ya ocupadas y así aumentar el número de combinaciones posibles se utilizó una variante del EGFP denominada mT-Sapphire. Esta proteína está caracterizada por tener una gran separación entre su pico máximo de absorción y el de emisión (esta diferencia se denomina *Stoke shift*). Este gran *Stoke shift* permite que se utilice la región donde emite el YFP ya que aunque solape la emisión del YFP y del mT-Sapphire, ambas son excitadas en regiones espectrales distintas.

A fin de aumentar las combinaciones posibles de proteínas fluorescentes y por tanto el número de marcas específicas, se generaron formas de estas proteínas expresadas únicamente en el núcleo de las células. Para ello se clonó en la región 5' del mismo marco de lectura de cada proteína fluorescente, la secuencia para la histona humana H2B, lo que permite que se produzca una proteína de fusión H2B:XFP que se transporta automáticamente al núcleo celular sin producir un efecto perjudicial en las células. De este modo, las células podrán expresar o no y a distinto nivel las seis proteínas fluorescentes en el citoplasma o en el núcleo. Además, debido a que las células están caracterizadas por una marca citoplásmica y otra nuclear, se incrementa enormemente el número de marcas fluorescentes específicas que pueden adquirir las células.

Por otro lado, para la generación de las distintas marcas fluorescentes se hace necesario conseguir un nivel de expresión suficiente en las células progenitoras. Aunque hay distintas formas para obtener esto, en este trabajo se eligió el uso de la electroporación ya que permite un equilibrio entre el marcaje efectivo de un número de células suficiente, pero no excesivo que haría mucho más difícil su análisis. Esta técnica se basa en la aplicación de un campo eléctrico mediante dos electrodos que produce la desestabilización de la membrana celular y la formación de poros por los que se introduce el DNA plasmídico. Este proceso de penetración se ve favorecido por el efecto electroforético producido por el campo eléctrico sobre el DNA, cargado negativamente a pH fisiológico por la presencia de grupos fosfato. Así pues, para alcanzar las zonas proliferativas donde se encuentran la mayoría de progenitores se inyecta DNA plasmídico en los ventrículos laterales de embriones *in utero* de distinta edad y se aplica un campo eléctrico con electrodos localizados a ambos lados de la cabeza del animal. Este campo consiste en cinco o más pulsos cuadrados de un voltaje específico en función de la edad del embrión.

Debido a que los astrocitos se producen tardíamente en el desarrollo y a través de múltiples ciclos de división celular, los protocolos clásicos de electroporación *in utero* fallan cuando intentan marcarlos debido principalmente a la dilución del plásmido, que impide que exista una concentración suficiente para que sean expresados en estas células. Por esta razón, para conseguir marcar las poblaciones astrocitarias se llevo a cabo una modificación del método de electroporación clásico, mediante la utilización de un sistema de transposición. Este sistema, generado a partir del transposón Piggybac, hace posible la integración de secuencias específicas en sitios TTAA de regiones aleatorias del genoma (Cary y cols., 1989). De este modo, dicha integración permite que las células adquieran distintas copias de la secuencia que codifica para cada proteína fluorescente. Además, este proceso es completamente aleatorio y conduce a que cada célula exprese distintas cantidades de algunas de las proteínas fluorescentes. Asimismo, como la integración se produce en el genoma, esta marca es heredable y bastante estable por todo el linaje derivado de la célula que adquirió primeramente la marca por electroporación.

El sistema Piggybac se divide en dos plásmidos. El primero contiene la secuencia a integrar flanqueada por dos secuencias consenso repetidas. El segundo contiene el marco de lectura que codifica para la transposasa Piggybac específica. De este modo, en las células que contienen ambos plásmidos se produce el reconocimiento por parte de la transposasa de las secuencias consenso, de forma que corta por esas secuencias e integra toda la región que flanquean en una región aleatoria del genoma. Por tanto, este transposón, que en su forma natural posee ambas secuencias repetidas flanqueando el gen de la transposasa, salta de una región a otra mediante un mecanismo de corta-y-pegar (otros transposones lo hacen mediante copia-y-pegar) mientras esté presente la actividad de la transposasa.

El último elemento necesario en nuestro sistema es la presencia de un promotor específico para regular la expresión de las proteínas fluorescentes únicamente en el linaje astrogliar. Para ello se eligió el promotor del GFAP humano, que se expresa únicamente en glía radial y astrocitos. Para aumentar el nivel de expresión por la estabilización del RNAm, se incorporó la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

B. PRUEBAS PRELIMINARES DE STAR TRACK PARA EL MARCAJE DE LINAJES ASTROCITARIOS

Partiendo de la necesidad de todos los elementos descritos previamente, se generaron doce vectores que consistían en dos secuencias consenso repetidas que flanqueaban una región hGFAP-XFP-pA. Estos doce vectores, que se fueron incorporando a lo largo del trabajo en función de su necesidad, correspondían a las seis proteínas fluorescentes expresadas bien en citoplasma o núcleo (por la fusión a la H2B). La mezcla de los doce vectores más un vector con la secuencia codificante de la Transposasa bajo regulación del promotor ubicuo CMV (plásmido mPBase) se inyectó en los ventrículos laterales de embriones E13-E15, tras lo cual fueron electroporados en la región de los ventrículos laterales o ventrículo olfativo. Repasando el mecanismo, la electroporación haría que los distintos plásmidos penetrasen en las células y una vez expresada la transposasa, ésta integraría aleatoriamente un número variable de copias de algunos de los plásmidos, lo cual conduciría a la expresión de una combinación específica de proteínas fluorescentes en citoplasma y/o núcleo.

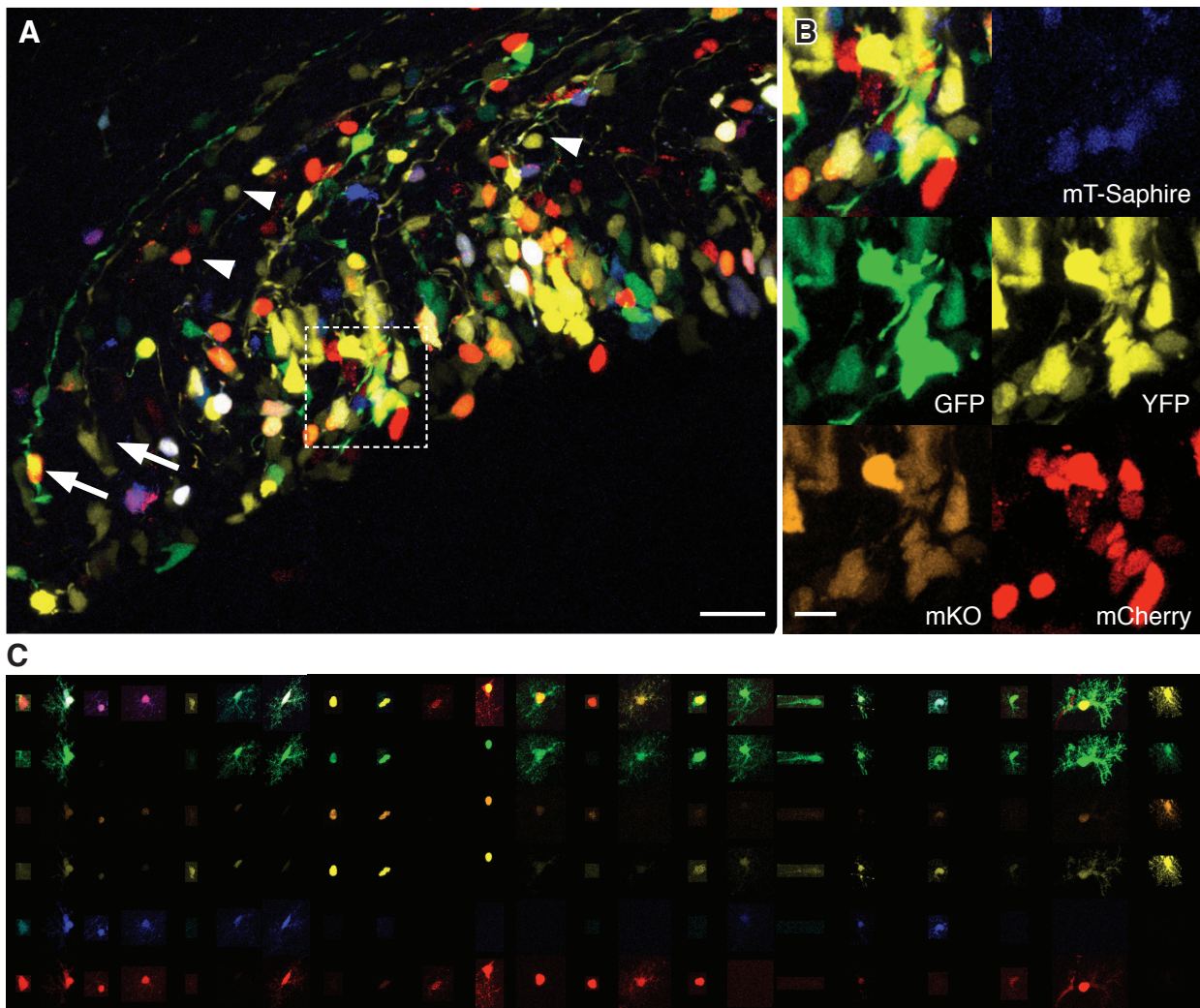


Figura 52. Pruebas del funcionamiento de Star Track *in vivo*. **A.** Imagen de la región electroporada correspondiente a la VZ/SVZ de un ratón de edad E18. Esta imagen revela el funcionamiento de Star Track, si bien debido al número de células y de marcas generadas, se hace difícil discriminar por completo los distintos grupos, aunque sí muchos de ellos. Las células marcadas corresponden a células endimarias, glía radial y algunos tipos celulares indiferenciados. **B.** Imagen por separado de cada uno de los fluoróforos de una ampliación de la imagen anterior: zona electroporada, mostrando la presencia de un pequeño grupo de células que por su cercanía espacial, parecen haber resultado de varias mitosis recientes. **C.** Muestra de distintas marcas obtenidas mediante la utilización de Star Track. En la primera fila se muestra la suma de los distintos fluoróforos, que se muestran por separado en el resto de filas. Para el trabajo recogido por esta figura completa, se utilizaron únicamente 5 de los 6 fluoróforos disponibles. Escala = 25 μm en A; 10 μm en B.

Esto produciría una gran diversidad de marcas celulares en las zonas proliferativas (**Figura 52**).

Para examinar la efectividad del método, se analizaron los cerebros a E18, pudiendo constatar la presencia de multitud de células ventriculares y subventriculares (**Figura 52A-B**). Entre estas células se observaron una gran número de células que por sus largos procesos radiales y su activación del promotor GFAP correspondían a células de glía radial. Estas células en ocasiones tuvieron somas separados de la VZ sugiriendo que estaban abandonando las regiones

proliferativas en su proceso de transformación a astrocitos. Las células de glía radial coexistieron con otro tipo de células ventriculares y subventriculares de somas pequeños y sin apenas procesos. Muchas de estas células podrían corresponder a neuronas u otro tipo de células no astrogiales que habiendo derivado de células de glía radial u otras con el promotor GFAP activo, apagaron dicho promotor pero retuvieron por un tiempo las proteínas fluorescentes ya expresadas. Algunas de éstas células pequeñas aparecían aglutinadas en grupos de células con la misma marca, que parecían corresponder a grupos derivados del mismo progenitor. Sin embargo, debido a que en esta zona se genera una marca distinta por célula y a la multitud de células presentes, fue casi muy arduo dilucidar a ciencia cierta qué células eran hermanas. Además, en la foto compuesta por todos los canales fue muy difícil aclarar qué combinación específica presentaba cada célula ya que por ejemplo los tonos naranjas pueden corresponder a la expresión de mKO o a la combinación de YFP y mCherry. Por tanto, fue una tónica general en este trabajo la necesidad de analizar los canales por separado. Así pues, el análisis de los cerebros en edad adulta reveló que la marca generada es estable y se mantiene por tiempo indefinido, como se muestra en la **Figura 52 (B)**, que recoge una muestra de distintos tipos de marcas encontradas.

C. RELACIÓN ENTRE LA REGIÓN ELECTROPORADA Y LA MIGRACIÓN DE PROGENITORES ASTROGLIALES

Cuando se analiza el destino migratorio de las células que se generan en las zonas proliferativas electroporadas, se observa principalmente un patrón que va desde dichas regiones hasta distintas áreas de la corteza, coincidiendo, prácticamente por completo, con el trayecto de los procesos de glía radial presentes en esta edad (**Figura 53A-B**). Así pues, desde regiones dorsales de la VZ/SVZ (de los ventrículos laterales), migración y procesos discurren radialmente para alcanzar la superficie pial de las partes más dorsales de la Cx. Por otro lado, desde zonas dorso-laterales de la VZ/SVZ (también de los ventrículos laterales), tanto la migración como los procesos radiales transcurren pegados al cuerpo calloso hasta que en la región lateral de la corteza giran 90° para alcanzar la superficie pial. Asimismo, desde regiones laterales del ventrículo lateral, parten fibras radiales con una ligera inclinación ventral atravesando las regiones correspondientes al estriado para acabar en la región pial de la corteza lateral. Además, desde la región más rostral (que es también dorsal) de los ventrículos laterales, procesos radiales y migración transcurren también radiales para alcanzar la parte más rostral de la Cx (**Figura 53B**). Esto hace que en los cortes coronales se aprecien los procesos radiales como puntos o pequeños trazos en dirección perpendicular al eje de corte. Cuando la electroporación alcanzó la región del ventrículo olfativo fuera del BO, la migración y los procesos de glía radial emanan radialmente hasta alcanzar los límites de la SVZ/RMS (región correspondiente a la SVZ del ventrículo olfativo que será la RMS en adulto), donde giran 90° para acompañar un trayecto más o menos largo en dirección rostral paralelos a los límites de la SVZ/RMS (**Figura 53A-B**). Después vuelven a girar 90° para terminar en la superficie pial del tubérculo olfativo y núcleo olfativo anterior. Por último, aquellas electroporaciones que alcanzaron el ventrículo olfativo dentro del BO, produjeron perfiles migratorios y de glía radial prácticamente radiales desde el mismo ventrículo olfativo a las capas nerviosa y glomerular del BO (**Figura 53A-B**).

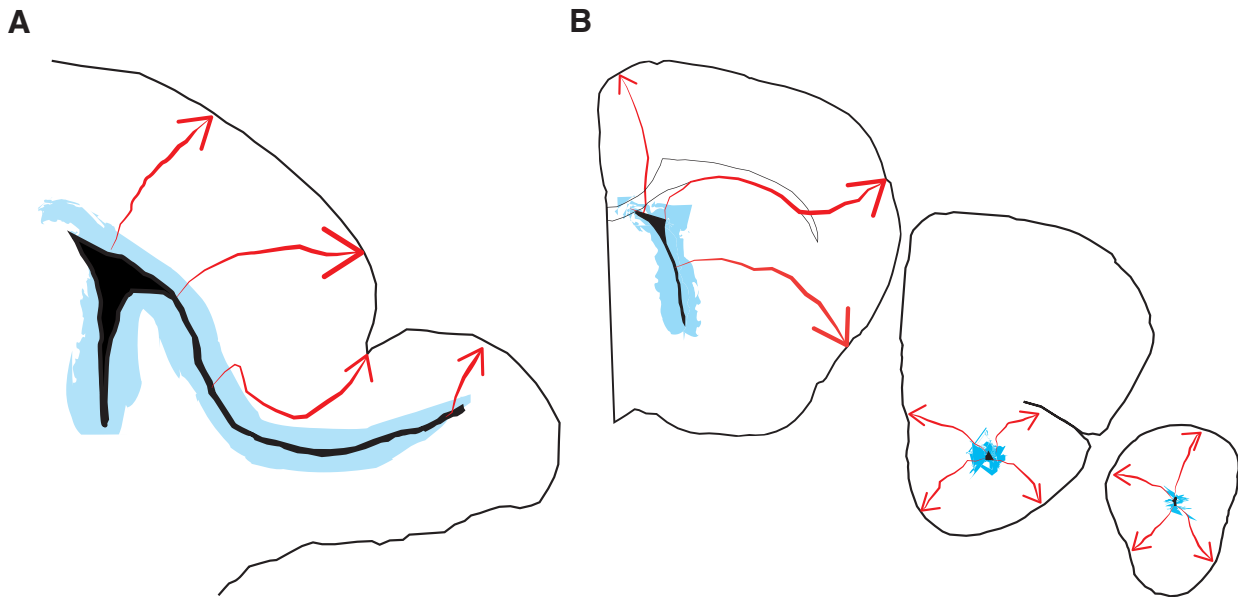


Figura 53. Esquemas sobre las rutas de migración de los progenitores astrocitarios. Esta migración es prácticamente idéntica a la que siguen los procesos de glía radial. **A.** Corte sagital mostrando que las rutas de los progenitores son más bien caudo-rostrales, y bastante radiales en este plano, desde la posición del ventrículo a la superficie pial. En el caso de la SVZ/RMS, comienza siendo radial desde el ventrículo pero luego gira 90 ° y acompaña un pequeño tramo la región subventricular para volver a girar cerca de 90 ° y así alcanzar la superficie pial. **B.** Cortes coronales dispuestos desde la zona más caudal (arriba) hasta la región rostral que corresponde al BO. En este caso la migración es prácticamente radial, con la excepción de a nivel del ventrículo, donde se caracteriza por comenzar casi en dirección ventro-dorsal, seguir en dirección medio-lateroventral, para girar 90° y alcanzar la superficie pial. En azul claro se muestra la zona subventricular y en rojo la dirección de migración y procesos radiales.

D. ANALISIS DE LA DISPERSIÓN INICIAL DE PROGENITORES ASTROGLIALES

En un intento de comprender los primeros pasos en la dispersión de progenitores gliales en el cerebro, se estudiaron en edades tempranas (E18, P0) algunas de las regiones correspondientes a los destinos migratorios de los progenitores astrogliales. Debido a que el fin de analizar estos destinos migratorios fue principalmente conseguir una visión general y no un análisis exhaustivo, partimos de la utilización de mezclas con no todos los vectores.

En un corte representativo de la dispersión clonal de progenitores gliales en Cx se encontraron, entre las empalizadas de glía radial, distintos tipos de células, algunas formando grupos de células próximas con la misma marca (**Fig 54A-F**). En este estadio la mayor parte de células muestran somas grandes que con frecuencia reflejaron aparentes eventos mitóticos. Entre las células agrupadas, fue remarcable la aparición de los primeros clones de futuros astrocitos. Estos clones, todavía formados por astrocitos inmaduros con grandes somas y procesos groseramente ramificados, se encontraron en distintas capas de la Cx. Su morfología fue en muchos casos asimétrica y estuvieron formados por menos de 10 células. Otro de los tipos de células agrupadas correspondieron a células dispuestas tangencialmente en la superficie pial y caracterizadas por morfologías aplanadas e indefinidas con algunos procesos sobre todo en el lado no

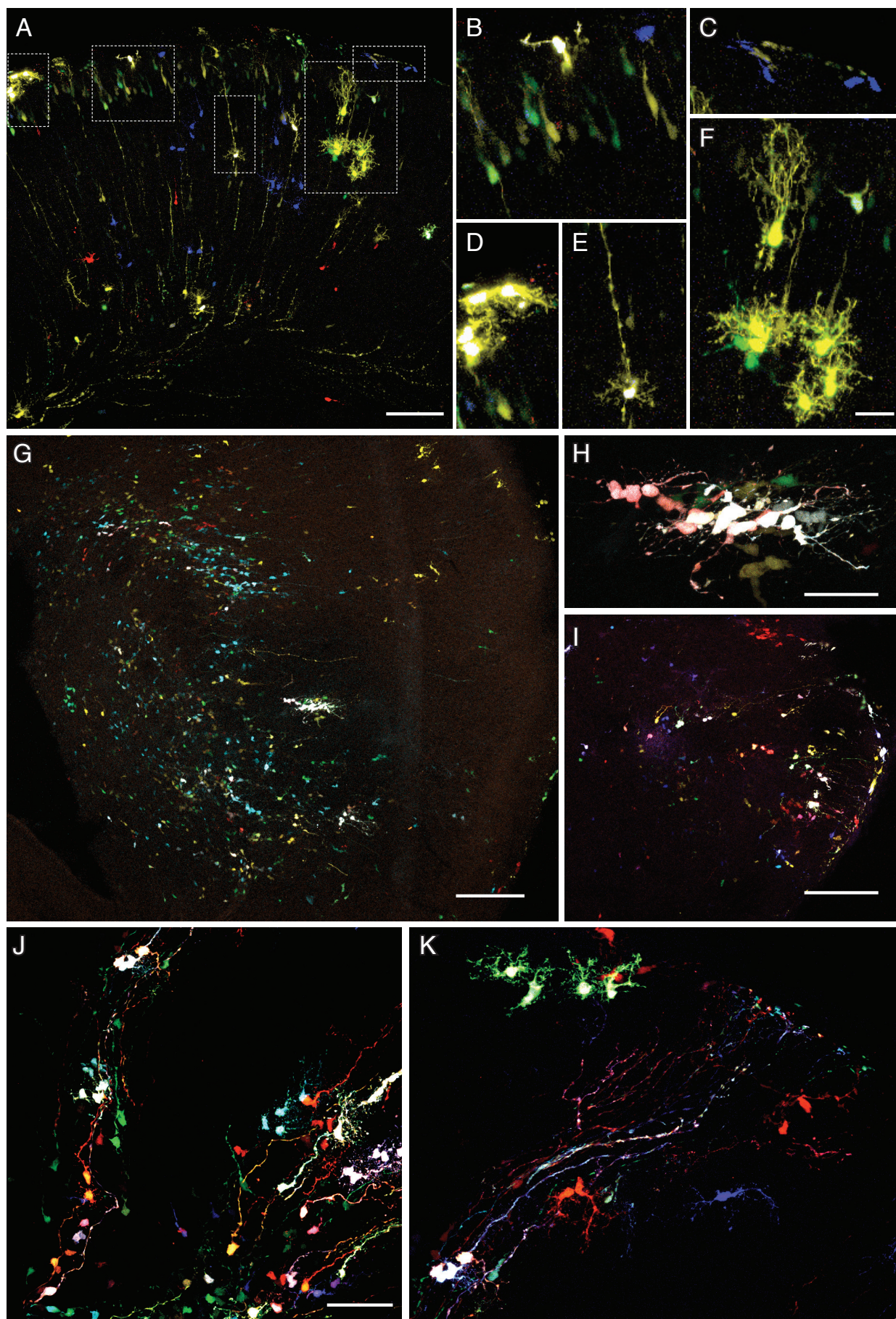


Figura 54. Dispersión temprana de los linajes astrocitarios. **A.** Sección coronal que muestra la dispersión clonal astrocitaria a nivel cortical en E18. En parte de abajo de la imagen se distinguen los procesos de glía radial paralelos que sufren un giro de 90 ° en esta región, alcanzando la superficie pial. **B.** Ampliación de la imagen anterior que muestra neuronas de capa 2/3 que aparecen marcadas ya que retienen algo de proteína fluorescente al proceder de progenitores que expresaban GFAP. Estas células no aparecen en edades posteriores. **C-D.** Clones de progenitores astrocitarios que se sitúa en la región pial/subpial. **E.** Célula de glía radial en su transformación a astrocito. **F.** Clon de futuros astrocitos protoplásmicos. **G.** Dispersión clonal en un corte coronal a nivel del estriado tras electroporaciones en la pared lateral del ventrículo lateral de animales P0. **H.** Detalle de uno de los clones que por el gran nivel de expresión parece de fenotipo astroglial. **I.** Dispersión clonal a nivel del núcleo olfativo anterior, región por donde transcurre la RMS, vista en un corte coronal en un animal P0. **J.** Dispersión astrocitaria a nivel del BO en cortes coronales. Escala = 100 µm en A, G y J; 25 µm en B-F; 50 µm en H, J, K.

pial. Entre las células individuales cabe destacar la presencia de glía radial transformándose y de neuronas de capa 2/3 con un leve marcaje., debido a que estas neuronas derivan de progenitores GFAP positivos (glía radial) y aunque han apagado el promotor GFAP, retienen algo de proteína fluorescente. Este patrón de diferenciación temprana de los astrocitos es similar en el estriado, donde a pesar del gran número de células que probablemente son neuronas, se pueden observar grupos con mayor fluorescencia y aspecto similar a las de Cx (**Fig 54G-H**) y en la región del núcleo olfativo anterior, a la cual llegan células cuando se electropora el ventrículo olfativo en su parte no bulbar (**Fig 54I**).

En los casos en los que la electroporación alcanzó la parte bulbar del ventrículo olfativo (**Fig 54J-K**), el patrón de dispersión temprana no fue muy distinto al que ocurre en Cx y estriado. Así pues, este patrón estuvo caracterizado por la presencia de células de glía radial con procesos irregulares y sinusoidales que evidenciaron en algunos casos mitosis fuera de la zona ventricular. Fue también frecuente la presencia de grupos de cuatro o cinco células con la misma marca fluorescente que fueron muy similares a los grupos encontrados en Cx y estriado (**Fig 54K**). Estos grupos estuvieron distribuidos prácticamente por todas las capas, siendo especialmente interesante la presencia ya desde estos estadios de grupos de progenitores astrocitarios a nivel de la GL/ONL.

E. DINÁMICA DE DISPERSIÓN CLONAL ASTROCITARIA TEMPRANA EN CORTEZA

Se llevaron a cabo cultivos (2 DIV) de rodajas de cerebros de animales P0 previamente electroporados. Las rodajas se examinaron con un filtro general para los fluoróforos verdes/amarillos y otro para los naranjas/rojos, debido a las limitaciones de nuestros equipos de microscopía que permiten a la vez mantener unas condiciones adecuadas de cultivo,

En un video representativo, se puede constatar que Star Track funciona perfectamente como método de análisis clonal ya que al menos durante el tiempo que duró el cultivo, las marcas fluorescentes se retienen entre células hermanas (**Figura 55; Video 1, Material Suplementario**). Por otra parte, los datos del cultivo muestran los patrones migratorios descritos anteriormente, con un intenso tráfico a gran velocidad a nivel de las capas bajas de Cx o cuerpo calloso, por dónde además transcurren los procesos de

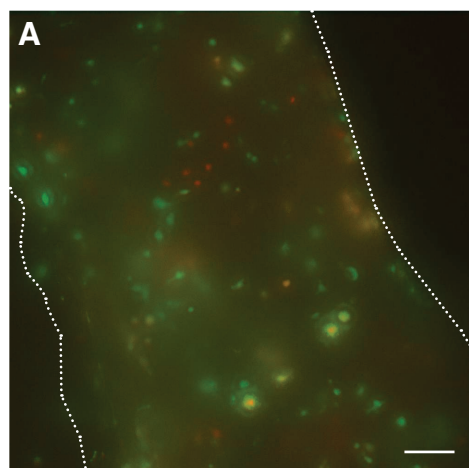
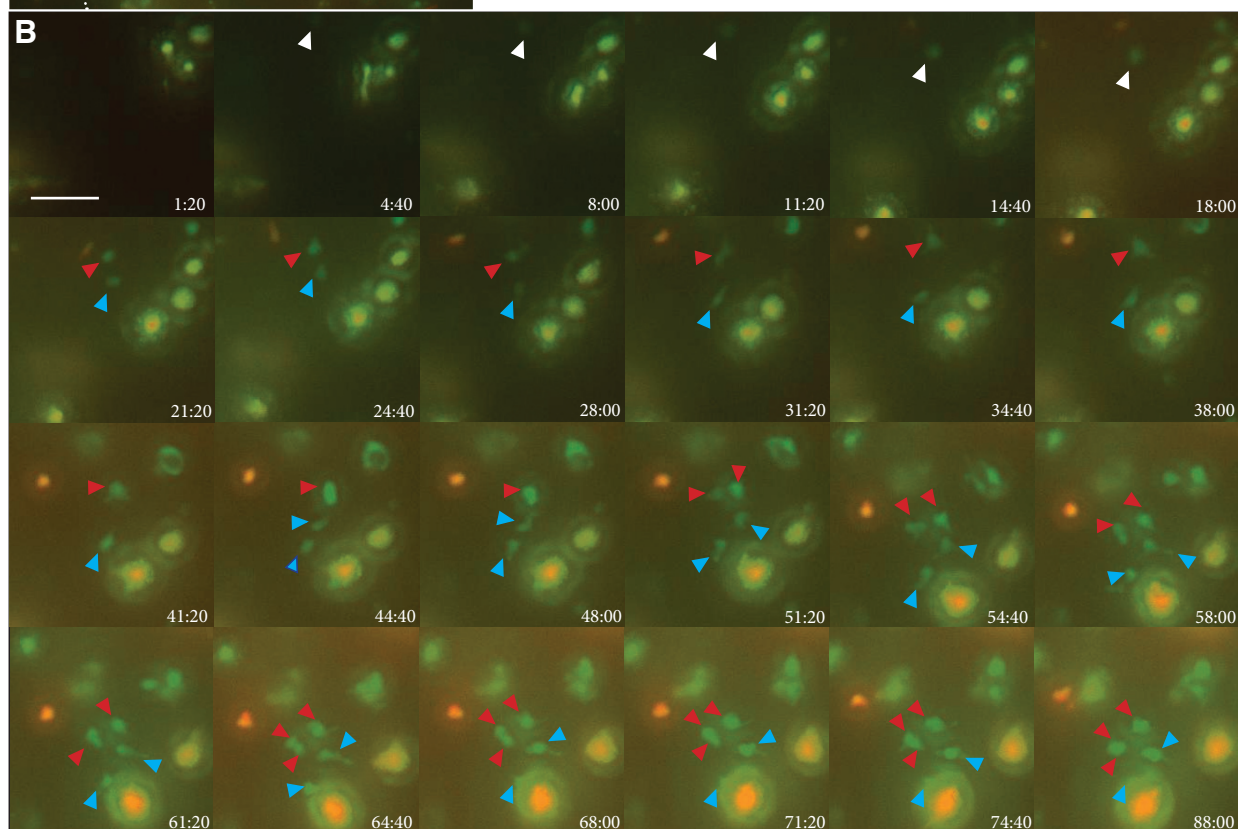


Figura 55. Dinámica de dispersión clonal astrocitaria temprana en cultivos de rodaja.

A. Corte coronal mostrando la región cortical en la que se llevó a cabo el estudio.

B. Secuencia de fotogramas del video. Las puntas de flecha rojas y azules indican la progenie de una célula marcada por una punta de flecha blanca. A su vez, también se marcan con otras flechas rojas y azules las hijas de la primera generación de células mostrada. Como se puede ver en esta figura, la división de los progenitores es aparentemente simétrica porque produce otros progenitores con capacidad de proliferación. wEscala = 100 μ m en A; 50 μ m en B.



glía radial y fenómenos de migraciones radiales asociadas a glía a nivel de las capas intermedias. Además, a pesar de las condiciones de resolución, las células mostraron las distintas morfologías observadas en imagen estática. Aparte de los patrones migratorios típicos estos resultados muestran la ocurrencia de comportamientos migratorios más o menos aleatorios de células que parecen haber perdido toda asociación con los procesos de glía radial. Así pues, muchas células presentan una gran movilidad con direcciones más o menos aleatorias aunque muchos otros grupos de células muestran muy poca. Estos últimos podrían ser grupos de células más diferenciadas que los anteriores. Esta diferencia de velocidad también ocurre a nivel de ciclo celular, con células de más rápida división que otras. Un hecho significativo fue la presencia de grupos celulares a nivel de la superficie pial que se dividen en esa región.

Una de las preguntas clave en este proceso de dispersión clonal es si existe un único progenitor que se va dividiendo por divisiones asimétricas que dan lugar a células asimétricas o si por el contrario, un

mismo progenitor da lugar a otras células con capacidad mitótica. Pues bien, los datos obtenidos en cultivo y reflejados en este video muestran cómo los progenitores se dividen y producen células que también se dividen, de modo que los grupos clonales tienden a expandirse exponencialmente (**Figura 55B**).

En conjunto, estos resultados proporcionan algunos aspectos preliminares sobre la naturaleza de los progenitores gliales y cómo éstos se dividen para formar grupos clonales.

F. PATRÓN DE DISPERSIÓN FINAL DEL LINAJES ASTROCITARIOS

Una vez aclarados ciertos aspectos preliminares sobre la dispersión temprana de los clones astrocitarios, pasamos a analizar los patrones finales de la generación de linajes astrocitarios en tejido adulto.

i. Cuerpo calloso y corteza cerebral

Un primer análisis general de cortes coronales a nivel de los ventrículos laterales muestra el rastro que deja la migración de progenitores gliales así como la trayectoria de los procesos de glía radial existentes en edades tempranas. A este nivel el patrón consiste en una corriente de células desde la SVZ más dorsolateral, siguiendo el curso del cuerpo calloso para alcanzar las capas de la corteza lateral (**Figura 56A**). Así pues, algunas escasas células invadieron territorio estriatal formando grupos de células hermanas. Incluso a esta edad fue evidente la persistencia de cohortes de células progenitoras a nivel de la SVZ más dorsolateral, siendo raro observar estas células a niveles más ventrales (**Figura 56B**). Entre estas células es general la existencia de células astrogliales con largos procesos radiales reminiscentes de las células de glía radial que nunca abandonaron esta región (**Figura 56C**). Estas células corresponden muy probablemente a los progenitores de interneuronas de BO (células B) debido a la gran correlación entre el marcaje de este tipo de células y la presencia de pequeñas células morfológicamente similares a neuronas en las capas de BO.

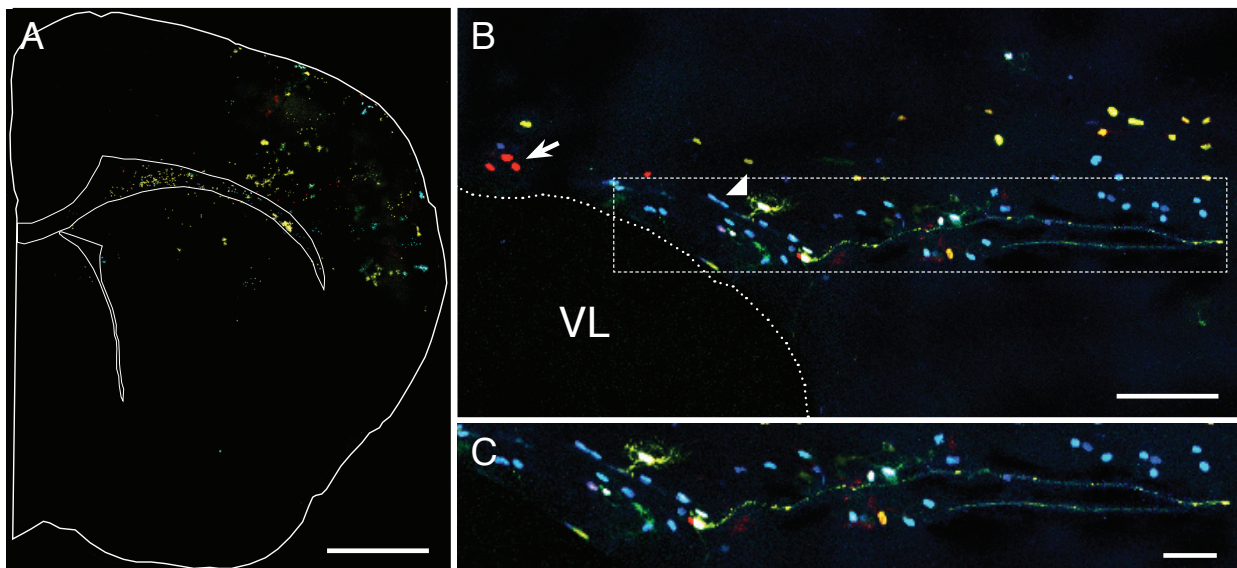


Figura 56. Patrón de dispersión clonal astrocitaria visto en adulto. **A.** Baja magnificación de un corte coronal. **B.** Ampliación del campo correspondiente a la región dorsolateral de la SVZ. La punta de flecha indica células parecidas a astrocitos. La flecha indica un clon de células con marcaje nuclear. **C.** Detalle de células parecidas a glía radial, reminiscente de edades tempranas. Escala = 1 mm en A; 100 μ m en B; 50 μ m en C.

Las pocas células encontradas en el BO, con el promotor GFAP apagado, retienen algo de marcaje por proceder de progenitores GFAP positivos. Así pues, a nivel de la SVZ también existen otras células con morfologías típicas de astrocitos (punta de flecha en **figura 56B**) y células de somas pequeños que podrían corresponder a neuroblastos generados a partir de células B o progenitores intermedios (flecha en **figura 56B**). En algunos casos, estas últimas células se agrupan por su marca fluorescente lo cual parece reflejar una división muy rápida. En su conjunto, las imágenes de esta región sugieren la persistencia de procesos de proliferación celular y migración que, además de la tan establecida neurogénesis, podría contribuir a la generación de tipos gliales incluso en adulto. No obstante, debido a la cantidad de células, al pequeño tamaño clonal y a la migración que hace que se separen mucho las células hermanas, obviamos esta región para analizar más profundamente la expansión clonal.

Siguiendo el curso de la migración temprana (y como hemos visto quizá también adulta), pasamos a analizar la dispersión clonal a nivel del cuerpo calloso (**Figura 57**). Debido a que la sustancia blanca alberga a los astrocitos fibrosos, tomamos esta región como paradigma de la expansión clonal de astrocitos fibrosos. Pues bien, en esta región es típica la existencia de múltiples células pequeñas con pocos procesos y que en muchos casos no parecen agrupadas por su marca fluorescente. Entre estas células, que probablemente corresponden a progenitores astrogiales, se encontraron los famosos astrocitos fibrosos. Estas células mostraron todas las características morfológicas propias de los astrocitos fibrosos descritos clásicamente, como la presencia de procesos citoplásmicos alineados en la dirección de los axones con ramificaciones no muy finas. Asimismo, esta alineación respecto a los axones callosos se tradujo tanto en grupos que o bien invadían el paso de los axones (**Figura 57B**) o bien se mantenían en los márgenes, flanqueando el cuerpo calloso (**Figura 57C**). Estos grupos de células cercanas, que además compartían la misma marca fluorescente, estuvieron compuestos por entre 5 y 20 células.

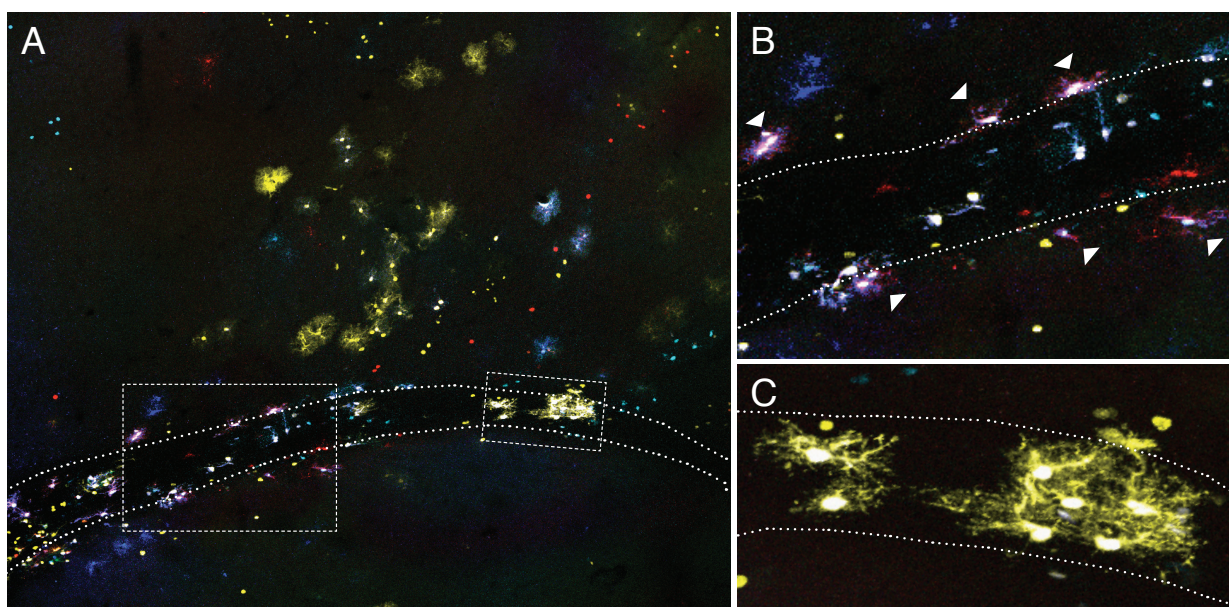


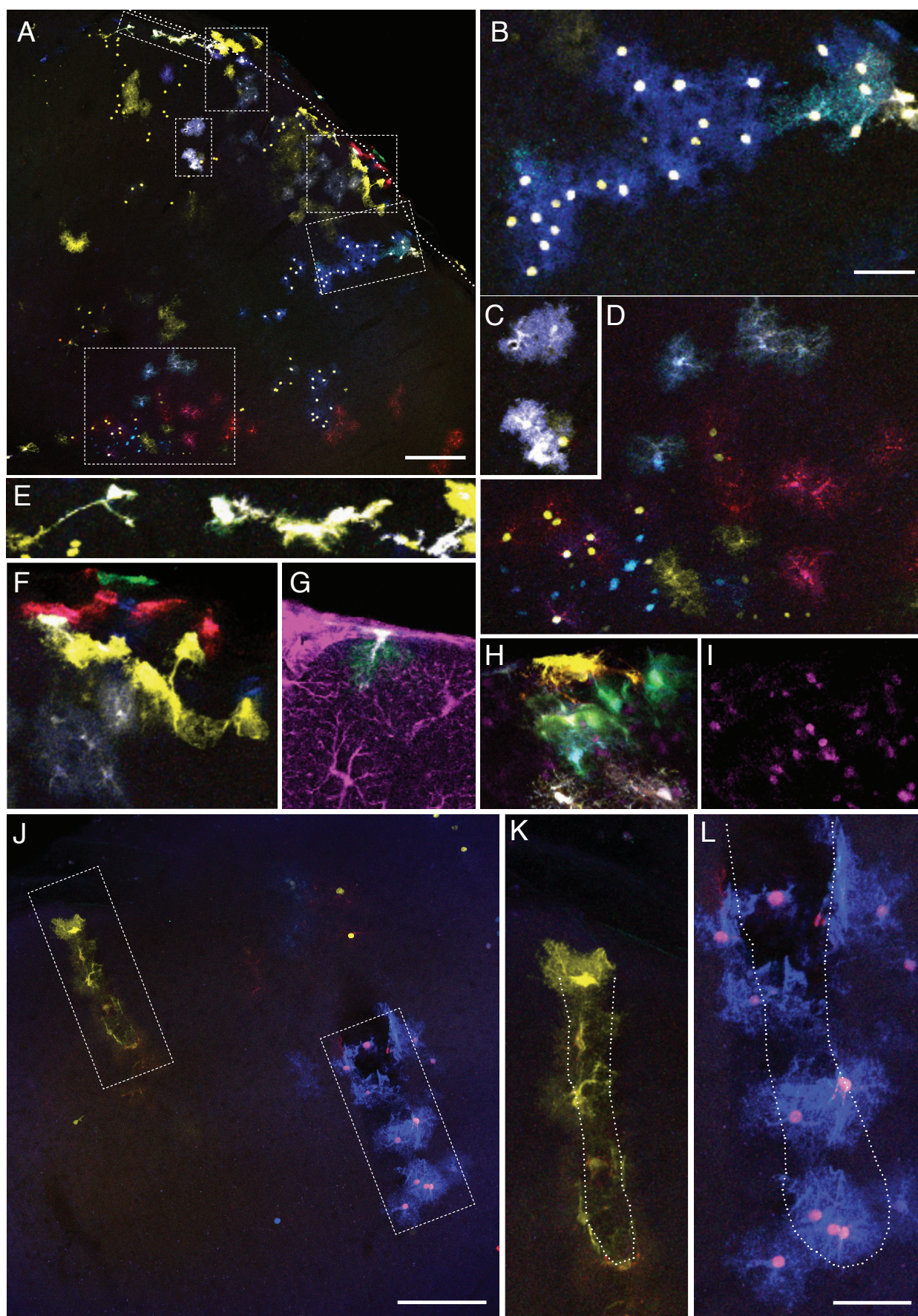
Figura 57. Dispersión clonal de astrocitos fibrosos en el cuerpo calloso. **A.** Vista general de la dispersión a nivel del cuerpo calloso en un animal adulto. **B.** Campo ampliado de la imagen anterior mostrando un clon de astrocitos fibrosos que flanquea los límites del cuerpo calloso. **C.** Campo a mayor aumento de la imagen A que muestra un clon de astrocitos fibrosos entre los axones del cuerpo calloso. Escala = 200 μ m en A; 50 μ m en B y C.

Dada la existencia de un gran número de células con marcajes simples y por tanto frecuentes en el cerebro y su expresión únicamente citoplásmica o nuclear de una o dos proteínas fluorescentes, muchas células fueron descartadas para el análisis clonal. Con el fin de estudiar las relaciones clonales de los astrocitos fibrosos, elegimos combinaciones complejas y por tanto poco frecuentes. Partiendo del estudio de las células con este tipo de marca, se llevó a cabo el análisis clonal de los astrocitos fibrosos a nivel de cuerpo calloso. Como se aprecia en **la figura 57**, este análisis reveló que los grupos clonales de astrocitos fibrosos fueron homogéneamente formados por estas células y que la marca de estos grupos no fue repetida otras regiones del cerebro. El hecho de que los grupos de astrocitos fibrosos fueran homogéneos, revela necesariamente que todas estas células proceden del mismo progenitor que llegó a esa región y se expandió a través de múltiples divisiones. Esto desvela, por tanto, la presencia de progenitores con potencial restringido a producir astrocitos fibrosos y por tanto un linaje último distinto entre astrocitos protoplásmicos y fibrosos.

La región del cuerpo calloso podría considerarse como la estación previa a la migración de progenitores astrogiales a las capas corticales (**Figura 58**). Esto se manifiesta en un patrón dispersivo que coloniza la corteza desde dentro hacia fuera. Precisamente, en la corteza se produjo la dispersión clonal en su máxima extensión, observándose grandes grupos clonales de astrocitos protoplásmicos formados por hasta 50 células. Estos grupos se dispusieron como esferas o elipsoides con su eje mayor dispuesto en diversas direcciones y en ocasiones ocupando varias capas corticales. Así pues, se observó una gran densidad de células astrocitarias a nivel de la superficie cortical, debido a la presencia de otro tipo de grupos clonales con menos de 10 astrocitos, que ocuparon tangencialmente la parte más superficial de la corteza (**Figura 58A,E**). Estas células de conformación atípica, con morfologías más bien laminares (similares a las de los fibroblastos) aunque en muchos casos emitiendo algunos procesos hacia el lado cortical, formaban parte de lo conocido como *glia limitans*, expresaban GFAP (**Figura 58G**) pero no Olig2 (**Figura 58H-I**)

Entre estos grupos clonales de astrocitos protoplásmicos corticales, fue especialmente remarcable la presencia de clones de astrocitos dispuestos en columnas casi perfectas y ocupando varias capas de la corteza (**Figura 58J-L**). En ocasiones, esta disposición columnar se relacionaba con un clon que rodeaba un único vaso sanguíneo. Los mecanismos que conducen a eso durante

Figura 58. Patrón de clones astrocitarios en corteza cerebral adulta. **A.** Sección coronal mostrando la región cortical y los distintos clones astrocitarios. Estos clones suelen ocupar varias capas corticales. Además existe una gran densidad astrocitaria a nivel pial. Al contrario que el resto de clones que ocupan varias capas corticales, existen clones a nivel pial que disponiéndose tangencialmente ocupan exclusivamente esta región. **B-F.** Detalles de distintos clones corticales. **G.** Inmunomarcaje para GFAP que demuestra que las células dispuestas a nivel de la pía son en realidad expresan también la proteína GFAP. **H-I.** Marcaje para Olig2 que demuestra que las células piales no expresan este marcador. **J.** Corte coronal que a nivel de corteza cerebral muestra dos clones asociados a vasos sanguíneos. **K-L.** Magnificaciones de la imagen anterior. Escala = 200 µm en A; 50 µm en B-I y K-L; 150 µm en J.



el desarrollo son casi enigmáticos ya que los primeros progenitores astrogiales ocupan la corteza cuando ya está invadida por los vasos sanguíneos y porque éstos son muy abundantes en toda la región cortical. Por tanto parece difícil que un grupo de células hermanas “decidan” ocupar el mismo dominio vascular en presencia de tan elevada densidad de vasos.

A pesar de que en casi todos los casos las células con marcaje fueron claramente astrocitos, en raras ocasiones también aparecieron unas células pequeñas y algo ramificadas, dispuestas también en forma de grupos de células hermanas que parecían corresponder a células NG2 o polidendrocitos aunque su naturaleza no fue analizada más profundamente. También en algunos casos aparecieron clones de oligodendrocitos con morfología mielinizante, caracterizada por sus procesos localizados paralelamente. Esto pone de manifiesto las posibles relaciones de linaje entre el linaje astrocitario y el de los oligodendrocitos o una posible activación anormal de este promotor en otros tipos de células. Además, no interfirió en nuestros análisis por ser fácilmente identificables ambos tipos celulares y distinguibles de los astrocitos.

a. Análisis de las poblaciones astrogiales piales en relación con su origen

La presencia de una gran cantidad de clones astrogiales a nivel de *glia limitans* y su alta homogeneidad por clon, nos hizo preguntarnos si procedían de un tipo de progenitor especializado en producir este tipo de células o si por el contrario estas células no son más que astrocitos adaptados a esa región. Por esta razón analizamos la proporción de células piales, caracterizadas por una morfología laminar y dispuestas en clones astrocitarios paralelos y proximos a la superficie cerebral (**Figura 59**). De este modo, en el caso de existir un progenitor común para astrocitos piales y protoplásmicos, la mayor parte de clones debieran ser mixtos, con presencia de astrocitos piales y protoplásmicos. De lo contrario, asumiendo la existencia de un progenitor especializado para producir astrocitos protoplásmicos y otro para piales, lo esperable sería que la mayor parte de clones fuesen heterogéneos, con presencia de ambos tipos celulares.

El análisis detallado de los clones próximos en menos de 100 μm de la superficie cortical reveló que un 87,3 % fueron completamente homogéneos (**Figura 59K**). Así pues, mientras que un 36,6 % estuvieron compuestos exclusivamente por astrocitos protoplásmicos, un 50,7% fueron grupos formados únicamente por astrocitos piales con morfología claramente laminar, demostrando la existencia de un progenitor especializado en la producción de astrocitos piales. De este modo el linaje astrocitario parece dividirse en tres: una rama para los astrocitos fibrosos, otra para los protoplásmicos y una más para los piales. Así pues, un distinto linaje de los astrocitos piales unido a sus diferencias funcionales, morfológicas y probablemente bioquímicas requiere una nueva clasificación que los incluya como un nuevo subtipo astrocitario.

ii. Corriente migratoria rostral

Avanzando rostralmente por los ventrículos laterales, examinamos el proceso de dispersión clonal en los casos en los que la electroporación alcanzó el tramo no bulbar del ventrículo olfativo. Esta región es particularmente importante en relación al trabajo descrito anteriormente y a que nunca antes se ha descrito el proceso de dispersión clonal de la glía en esta región.

En adulto, el ventrículo olfativo obliterado ha dado paso a la corriente migratoria rostral que como

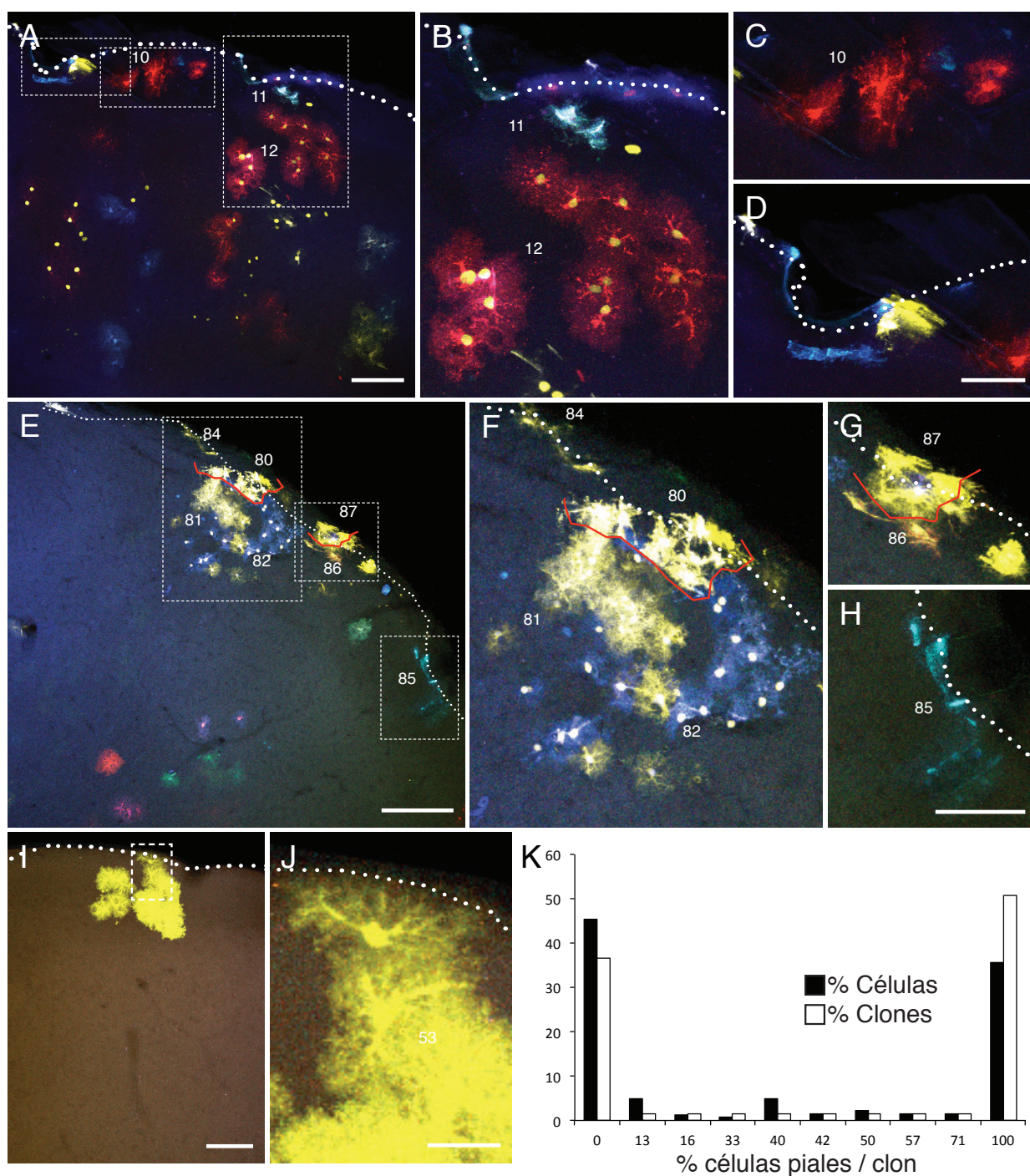


Figura 59. Clones de astrocitos piales en corteza cerebral de adulto. **A,E,I.** Secciones coronales de corteza cerebral que muestran la disposición clonal astrocitaria cercana a la pia. **B-D, F-G, J.** Ampliaciones de los campos de la imagen A, E e I respectivamente mostrando clones exclusivamente compuestos por astrocitos con morfología laminar aplanada (piales) y otros exclusivamente de astrocitos protoplásmicos muy cercanos a la pia. **K.** Gráfico que muestra el porcentaje sobre el total de células o de clones con un porcentaje determinado de astrocitos piales. Este gráfico demuestra que la mayor parte de clones cercanos a la pia están exclusivamente formados por astrocitos piales o protoplásmicos, pero apenas existen clones mixtos. Escala = 100 μ m en A, I; 50 μ m en B-D; 200 μ m en E; 100 μ m en F-H; 25 μ m en J.

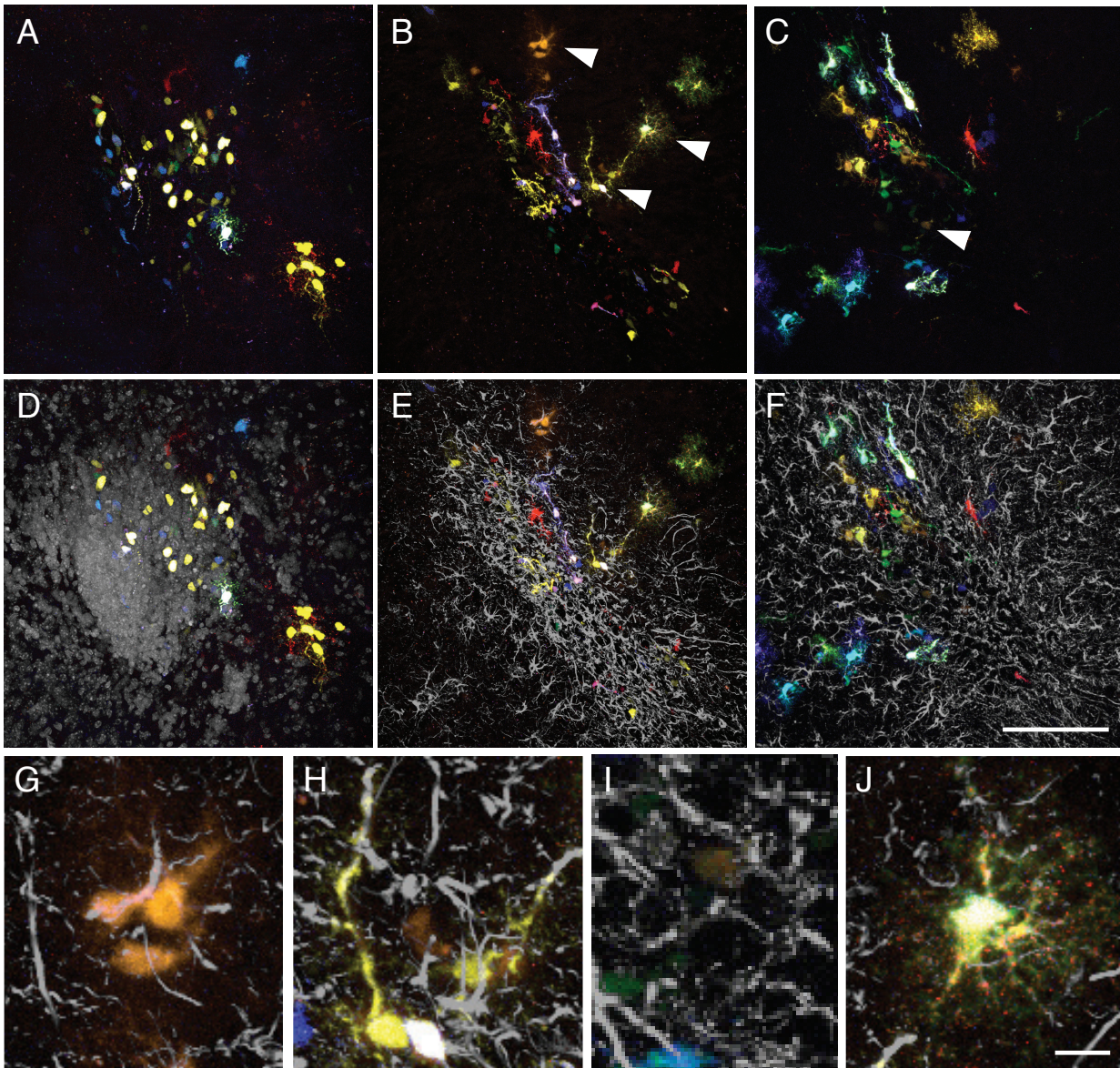


Figura 60. Dispersión clonal astrocitaria a nivel de la RMS en adulto. **A-C.** Secciones coronales correspondientes a la región de la RMS. **D.** Marcaje nuclear de la imagen A. **E-F.** Marcaje por inmunohistoquímica para GFAP de las imágenes E y F respectivamente. **G-J.** Ampliaciones de las imágenes E y F. Escala = 100 μ m en A-J.

hemos visto, conduce y está formada por la migración de neuroblastos desde la SVZ al BO. Pues bien, en esta región, la migración de progenitores astrogiales se produce desde el ventrículo olfativo hacia fuera de modo radial, desembocando en un patrón de marcaje caracterizado por la presencia de distintos tipos de morfologías (**Figura 60**).

Desde un punto de vista general, cabe destacar que los distintos subtipos astrogiales corresponden a células con morfologías poco diferenciadas que sugieren que estas poblaciones son bastante inmaduras. De hecho, uno de los tipos morfológicos más abundantes en la región de la corriente migratoria rostral fueron células con procesos radiales cortos y curvados. Estas células, con somas pequeños tanto dentro como en la

periferia de la RMS y con sus procesos dispuestos entre las cadenas de neuroblastos, parecían reminiscencias en adulto de glía radial (**Figura 60H**). Otro de los subtipos encontrados correspondió a células de somas grandes, con pocos procesos gruesos y algo ramificados en un pequeño dominio, que recuerdan a los progenitores astrocitarios encontrados en edades tempranas pero con dominios de arborización más pequeños. Estas células fueron frecuentes sobre todo dentro de los límites de la RMS, aunque a veces también se encontraron fuera. Aún así, no descartamos que al menos algunas de las células agrupadas en este subtipo sean en realidad del tipo descrito previamente pero proyectando su proceso radial en la dirección del eje caudo-rostral. Otro de los tipos astrogiales, que al contrario que los anteriores tuvo una apariencia más diferenciada, fueron células con morfología de astrocito protoplásmico algo modificada por su menor tamaño y ramificación (**Figura 60J**). Este tipo morfológico fue más abundante en los márgenes de la RMS y parecen corresponder a los astrocitos protoplásmicos que rodean esta corriente y que se adaptan al ambiente de tal peculiaridad cerebral. El último de los fenotipos encontrados, no correspondió a células astrocitarias. De hecho su leve marcaje hace pensar que se trata neuroblastos migrando desde la SVZ (**Figura 60I**). Como en otros casos, estas células retienen algo de marcaje debido a que aunque no expresan GFAP, derivan de progenitores GFAP positivos. Dada la atípica morfología de estas poblaciones astrogiales llevamos a cabo un inmunomarcaje para revelar la presencia de la proteína GFAP. Mientras que los tres primeros fenotipos morfológicos expresaron dicha proteína, el último, correspondiente a neuroblastos en migración, no fueron marcadas por tal inmunomarcaje. Esto confirma la naturaleza de los distintos tipos de células encontrados.

Desde el punto de vista del análisis clonal, se observaron claramente varios grupos pequeños de células hermanas (**Figura 60G**). Estos grupos, formados por cinco o seis células, fueron más abundantes en la periferia de la corriente migratoria y correspondieron principalmente a células astrogiales no radiales, con pocos y gruesos procesos (el segundo tipo descrito anteriormente). A pesar de la gran abundancia de marcas, por ser la región de electroporación, lo cual hizo difícil relacionar algunas de las células marcadas, parece evidente que existieron dos o tres células hermanas no muy agrupadas, pero cercanas, tanto en los fenotipos radiales como en el resto de los astrogiales, lo cual sugiere que pueden seguir generando células astrogiales incluso en edad adulta. En su conjunto, la presencia de grupos cercanos de células hermanas hace pensar que o bien la migración glial está muy reducida o que se siguen produciendo multitud de mitosis gliales y por tanto gliogénesis adulta en esta región.

Desde un punto de vista general, el patrón de marcaje refleja varios hechos significativos. El primero es que en la mayoría de los casos la RMS aparece más marcada en uno de sus lados, debido a que las electroporaciones, al no invertir los electrodos, solo afectan a uno de los lados del ventrículo (**Figura 60A-C**). Este patrón de marcaje encajaría con la hipótesis de que fue electroporado solo uno de los lados del ventrículo, el cual proporcionaría células principalmente solo para ese lado del parénquima. Esto por tanto parece reflejar una suerte de organización en la gliogénesis, de modo que uno de los lados del ventrículo produce células casi únicamente para esa región. Asimismo, la presencia de una mayor densidad de células en los límites de la RMS, parece indicar que la mayor parte de células marcadas en esta región corresponden a progenitores anclados en la región, que lentamente producirían otras células que migran hacia la periferia. Así pues, el contraste entre la alta densidad de células marcadas dentro de la RMS (zona proliferativa) y la baja densidad fuera, hace preguntarse si es la misma región del ventrículo olfativo la que da origen a la enorme cantidad de astrocitos que rodean la RMS.

iii. Bulbo olfativo

Al igual que en la RMS, la dispersión clonal de la glía en BO nunca ha sido descrita anteriormente. Esta razón, y también la relación con el trabajo presentado anteriormente sobre astrogliá y migración, hicieron esencial este estudio.

En una visión general, lo primero que se observa de forma mas clara que en la RMS, es que la astrogliogénesis ocurre de forma organizada (**Figura 61**). De este modo y con pocas excepciones, cada uno de los lados del ventrículo contribuye con células a la región bulbar del mismo lado de una forma organizada, que además coincide con la dirección de los procesos de glía radial temprana. Así pues, a medida que se avanzó en el análisis a capas más superficiales, la apariencia general del marcaje cambió desde células con pocos procesos a nivel de la ZSE a células con más procesos y más ramificados. Precisamente, en la capa más profunda del BO, la ZSE, fue muy común encontrar células similares a las descritas en la RMS, caracterizadas por su pequeño tamaño y escasa arborización. A pesar de que algunas de ellas fueron claramente neuroblastos por su marcaje tenue y su morfología, la gran mayoría correspondían a fenotipos astrogliales poco diferenciados. Este patrón fue similar en la capas granular, plexiforme interna/externa y mitral, aunque progresivamente el número de células con morfología típica de astrocito protoplásmico se fue incrementando y el número de células con pocos procesos se fue reduciendo conforme se fue avanzando en las capas hacia la superficie. En el caso de los astrocitos con forma protoplásmica, éstos dispusieron su árbol de procesos tanto de forma simétrica o asimétrica lo que dio lugar a una aparente gran heterogeneidad morfológica.

A pesar de que hasta la capa plexiforme externa el marcaje es relativamente similar al que se encuentra en corteza, fue característica de esta estructura la aparición de células astrogliales de morfología atípica en las capas glomerular y de nervios olfativos (**Figura 61H-K; Figura 62**). En la capa glomerular estas células se dispusieron alrededor de los glomérulos, mostrando morfologías de astrocito velado con grandes procesos proyectados tridimensionalmente en forma de lámina envolviendo los glomérulos, y cubriendo multitud de somas de células periglomerulares (**Figura 63, Video 2, Material suplementario**). A pesar de que en general los procesos astrocitarios fueron restringidos a las paredes de los glomérulos, otros astrocitos con morfologías similares invadieron el núcleo glomerular masivamente (**Figura 61N**). Además fue frecuente la existencia de astrocitos típicos protoplásmicos, sobre todo en la interfase entre la capa glomerular y la plexiforme externa.

Por último, a nivel de la capa de nervios olfativos, la apariencia de las células cambió poco, con la diferencia de que aquí no existen estructuras glomerulares a las que pudieran amoldarse. En esta capa fue casi inapreciable la existencia de astrocitos con morfología protoplásmicas. Asimismo, en la zona más superficial del BO, también se localizó una forma de *glia limitans*, caracterizada por células con una gran expresión del marcaje fluorescente y por grandes procesos proyectados hacia la capa glomerular (**Figura 61I**). Así pues, tanto en esta región como en la capa glomerular, la variabilidad morfológica de la astrogliá fue extraordinaria. Por esta razón y para confirmar

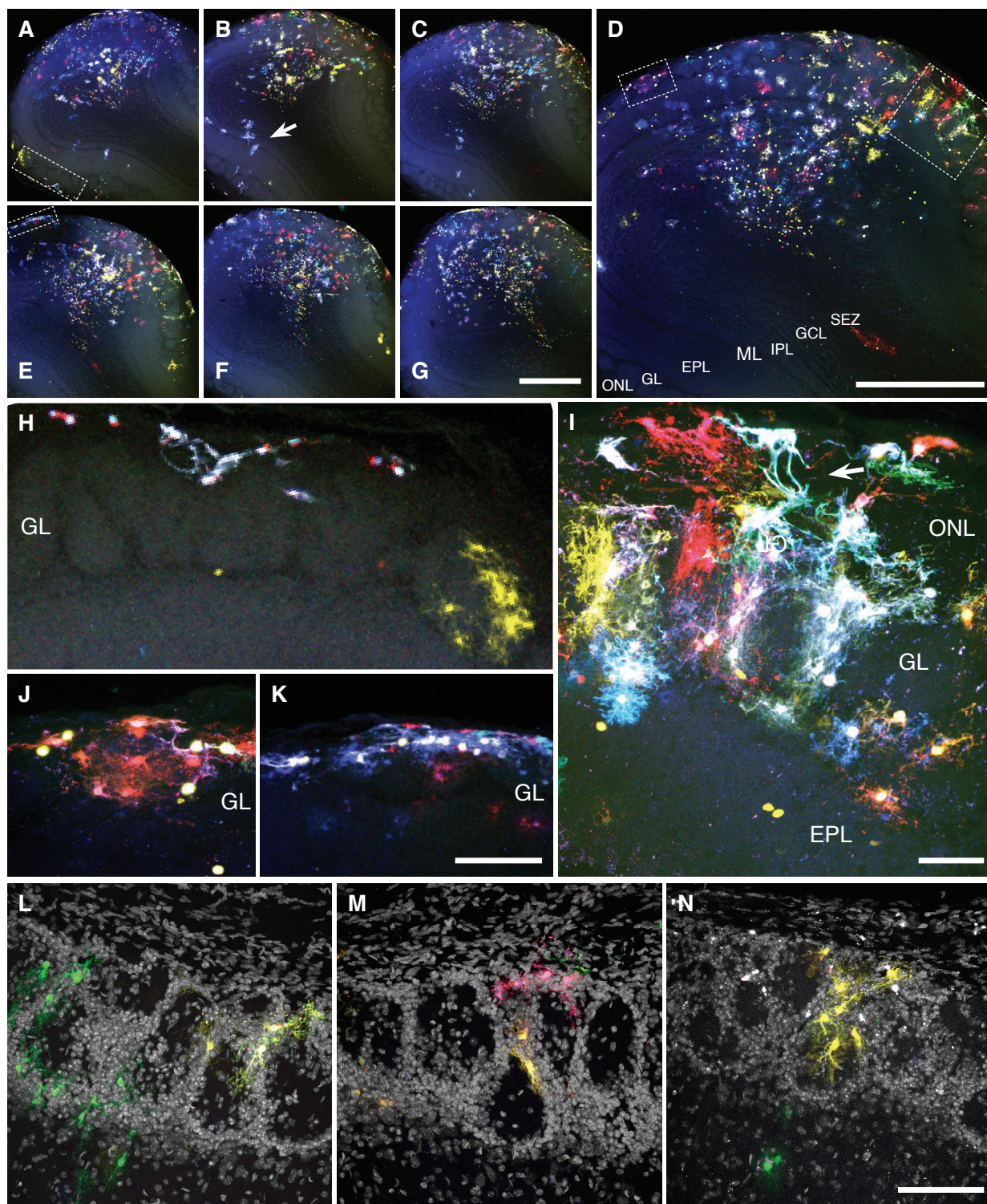


Figura 61. Dispersión clonal de astrocitos a nivel del bulbo olfativo adulto. **A-G.** Secciones consecutivas mostrando la dispersión clonal astrocitaria sobre las distintas capas bulbares. Los clones se dispusieron preferentemente en una o dos capas, aunque algunos de ellos ocuparon varias capas (flecha). **H-K.** Magnificaciones de los campos mostrados en A, D y E. Nótese la presencia de clones restringidos a uno o varios glomérulos (H y J) y clones dispuestos únicamente a nivel pial (H,K). **L-N** Secciones de bulbo olfativo marcadas con el marcador nuclear Draq5TM mostrando clones confinados en un único glomérulo. Estos clones se dispusieron en las paredes interglomerulares (clones amarillo en L y M) o dentro del neuropilo del glomérulo (N). Escala = 500 μ m en A-G; 100 μ m en H y K y L-N; 50 μ m en I-J.

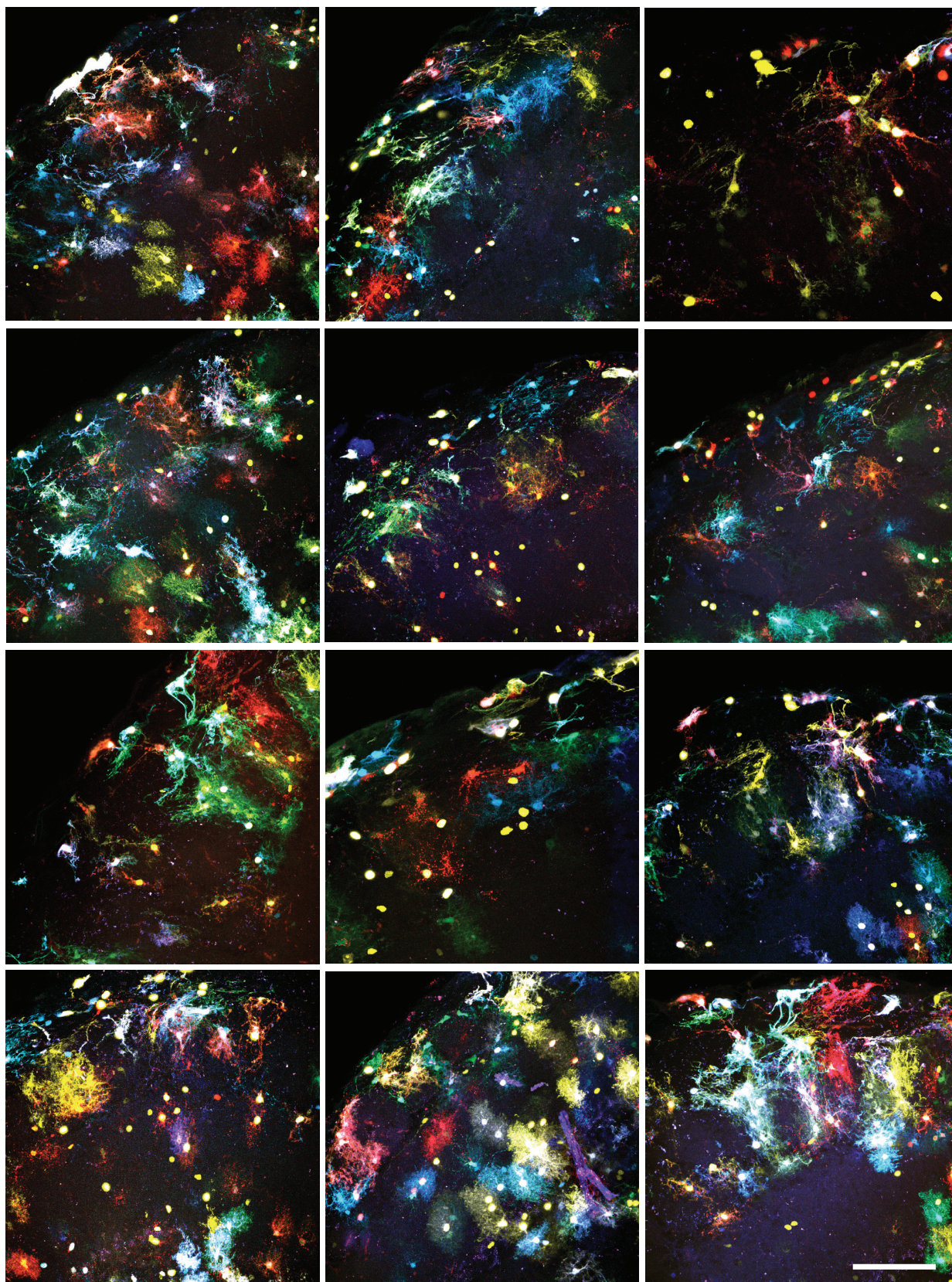


Figura 62. **Dispersión clonal en las capas glomerular y nerviosa del bulbo olfativo adulto.**
Escala = 100 μ m.

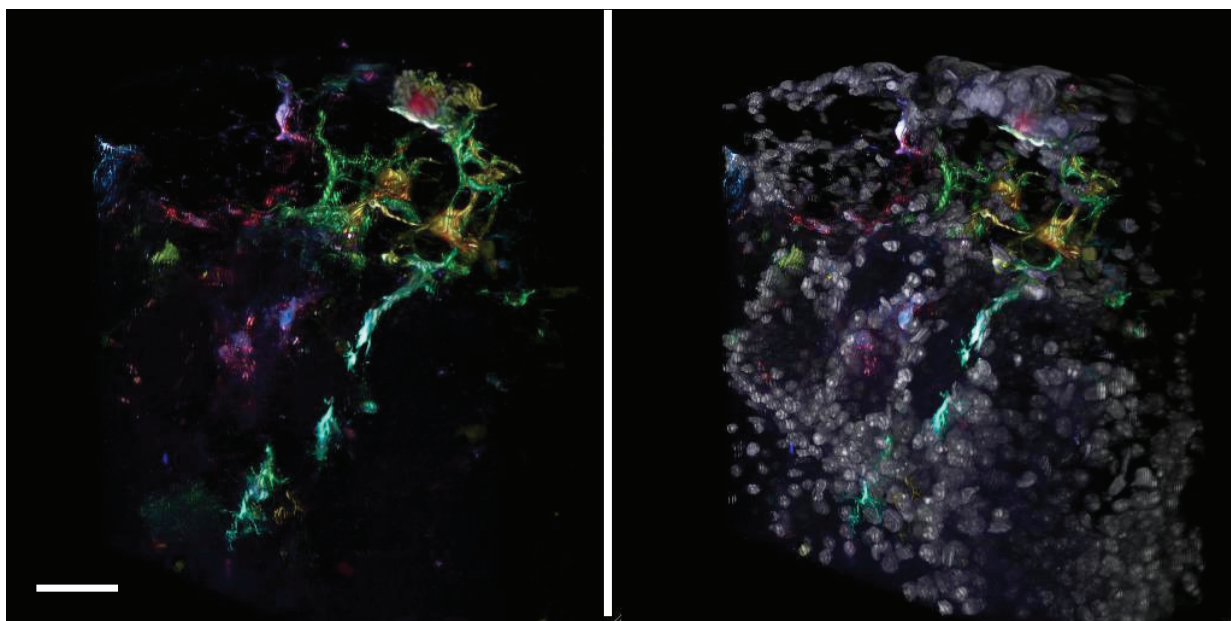


Figura 63. Reconstrucción tridimensional de la morfología de los astrocitos velados de la capa glomerular del bulbo olfativo. Escala = 50 μm .

que se trata verdaderamente de astrogliá y no una activación artefactual del promotor del GFAP, llevamos a cabo un marcaje inmunohistoquímico para el marcador astrocitario GFAP. En todos los casos estudiados, éstas células con morfologías atípicas expresaron también la proteína GFAP lo cual confirmó su naturaleza astrogliá (**Figura 64**).

El estudio de la dispersión clonal de los astrocitos reveló la presencia de grupos celulares menores que los corticales, que contenían hasta 20 células con morfologías diversas en función del clon y generalmente distribuidos por capas de un modo más restringido que en corteza. Por tanto, a pesar de que existieron grupos que se distribuyeron casi por todas las capas del BO, en

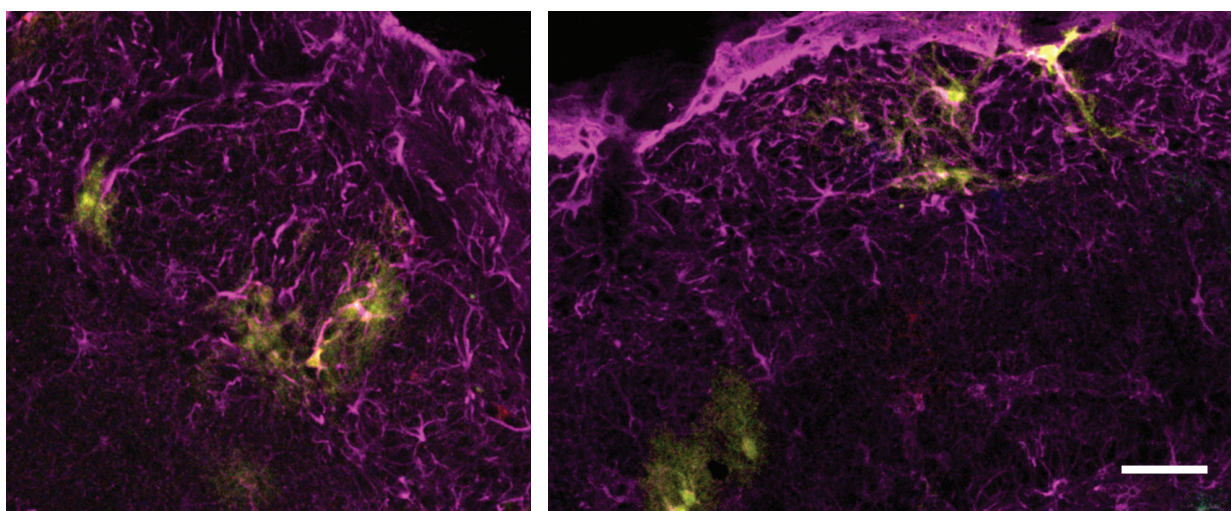


Figura 64. Las células marcadas en capa glomerular y nerviosa expresan la proteína GFAP. Escala = 100 μm .

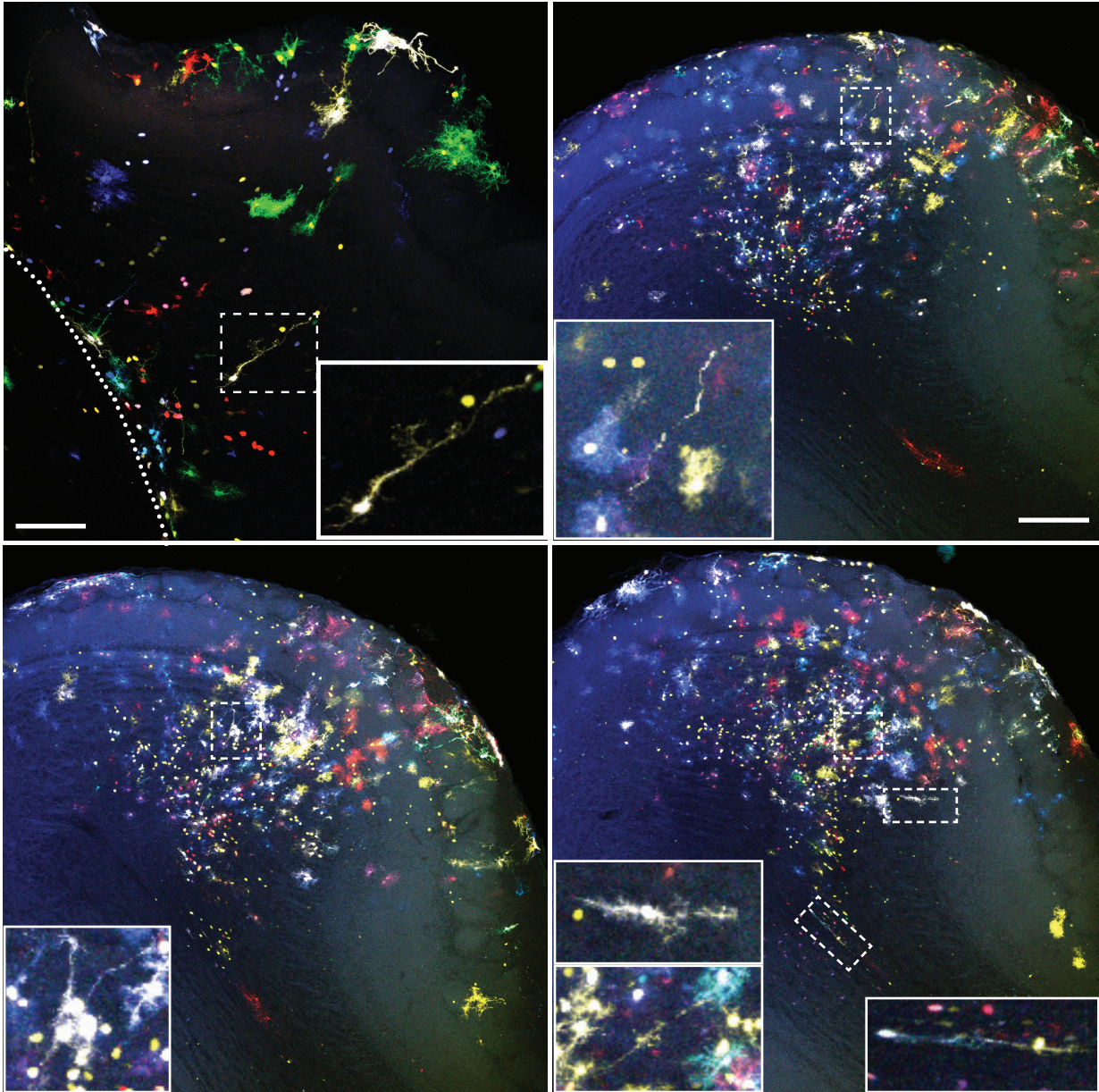


Figura 65. Presencia de células inmaduras en el bulbo olfativo. Escala = 100 μm en A; 100 μm ; 200 μm en B-D.

general los clones se localizaron en una o dos capas contiguas. Esto fue especialmente significativo a nivel de las dos capas superficiales, resaltando que en la capa glomerular los clones de astrocitos se distribuyeron ocupando un dominio muy restringido que generalmente consistió en uno o dos glomérulos olfativos. Otra de las peculiaridades reveladas por el análisis clonal de la generación de astrocitos fue el hecho de que muchos clones se dispusieron tangencialmente únicamente en la parte más superficial de la capa nerviosa. Estos grupos, que formaron parte de la *glía limitans*, fueron muy similares a los astrocitos piales corticales, con una morfología laminar paralela al eje de la superficie bulbar. No obstante, no se utilizaron para la cuantificación puesto que la gran variabilidad astrocitaria a nivel de ONL hizo imposible en muchas ocasiones distinguir la proporción de células piales por clon.

Un examen detallado de las secciones bulbares marcadas mediante Star Track, reveló la presencia de células con morfologías radiales dispersas entre el resto de astrocitos, incluso a nivel de la capa glomerular (**Figura 65**). Estas células fueron muy probablemente reminiscentes de glía radial. Esto, unido a la presencia de numerosas células en el BO con pocos procesos a nivel sobre todo de la ZSE y la capa granular más profunda, sugiere que en BO coexisten poblaciones inmaduras de astroglia que no se observan en corteza.

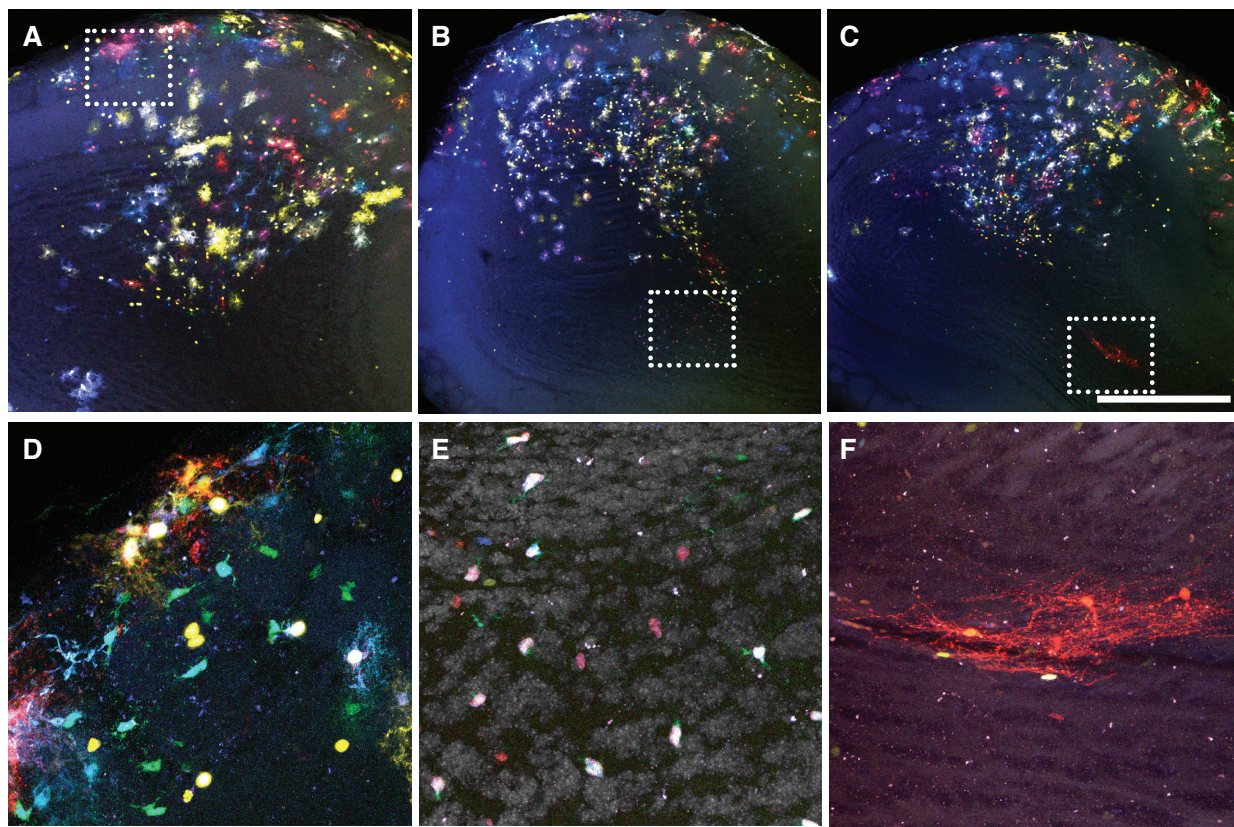


Figura 66. Células marcadas ocasionalmente aparentemente no astrogliales. A-C. Cortes coronales de bulbos olfativos adultos. **D-E.** Posibles polidendrocitos que aparecen en increíble cantidad de células por clon. Corresponden a magnificaciones de A y B respectivamente. **F.** Posibles oligodendrocitos presentes en las capas profundas del bulbo.

Así como se describió anteriormente para regiones corticales, en BO fue puntualmente observada la presencia de células que por su tenue marcaje o su morfología no fueron clasificables como astroglia (**Figura 66**). Este es el caso de los neuroblastos, que aparecen en BO con un leve marcaje cuando la electroporación incide también en la SVZ de los ventrículos laterales (y/o quizá también en regiones del ventrículo olfativo). También es el caso de un grupo clonal de cuatro o cinco células con morfología algo similar a la de oligodendrocitos dispuestas entre ZSE y capa granular. Sin embargo, algunas diferencias morfológicas con éstos como cierta irregularidad en sus procesos, su intensa expresión de los marcadores fluorescentes y su presencia en una región de sustancia gris hacen difícil clasificarlas claramente en el linaje oligodendrocítico.

Dentro de las células marcadas no astrogliales es tremendamente interesante la presencia de unas células muy pequeñas con muy tenue marcaje y con pequeñísimos procesos. Estas células,

relativamente frecuentes en grandes electroporaciones bulbares, aparecieron en grupos clonales de incluso más de doscientas células. Aunque podría tratarse de células NG2, debido a la falta de descripciones sobre estas células en BO, es difícil asegurar esto. Además, difieren de las posibles células NG2 que nosotros identificamos a nivel cortical en algunos aspectos como un marcaje más tenue y un mayor número de células por clon. A pesar de ser clarísimamente diferenciables de los astrocitos, de las neuronas y de los oligodendrocitos maduros, su naturaleza sigue siendo enigmática y requeriría un estudio focalizado.

DISCUSIÓN

Cada uno de los procesos del desarrollo cerebral emerge de una combinación de eventos, que a nivel celular, se manifiestan como intrínsecos o marcados de algún modo en la información celular y extrínsecos o dependientes de factores externos a la célula. Este trabajo desvela la heterogeneidad astrogliar intrínseca como un nuevo nivel de heterogeneidad que al menos parece resultar crítica para algunos procesos de desarrollo que ocurren en el cerebro adulto.

I. HETEROGENEIDAD ASTROGLIAL EN EL SOPORTE DE LA MIGRACIÓN *IN VITRO* DE PROGENITORES DE INTERNEURONAS DEL BULBO OLFATIVO

Los resultados expuestos en este trabajo revelan que la astrogliá soporta diferencialmente, en función de su origen permisivo o no permisivo, la migración *in vitro* de los neuroblastos de la RMS. Así pues, la astrogliá procedente de BO (camino y destino migratorio) y RMS (camino migratorio) soportan una extensa migración de estos neuroblastos, al contrario que la astrogliá de Cx y otras regiones adyacentes a la migración. Aunque estos datos apuntan a que la astrogliá *in vivo* podría poseer similares propiedades que son retenidas en los cultivos, de si estas diferencias son fiel reflejo de la permisividad *in vivo* o simplemente una correlación casual, dependerá completamente la importancia de las conclusiones de este trabajo.

A. CONSIDERACIONES PREVIAS SOBRE EL MODELO EXPERIMENTAL

Debido a las dificultades de estudio de los astrocitos *in vivo* y a pesar de los primeros intentos, entre 1970 y 1980 se popularizaron varios métodos de cultivo de astrocitos que, basándose en el uso de tejido temprano, permitían obtener grandes cantidades de glía (Booher y Sensenbrenner, 1972; McCarthy y De Vellis, 1980). El desarrollo de este tipo de cultivos ha resultado en infinidad de estudios sobre astrogliá, que en muchos casos fueron la antesala a estudios demostrando lo mismo *in vivo*. Este es el caso, por ejemplo, del papel de los astrocitos en la transmisión sináptica (ver revisión en Araque y Perea, 2004). No obstante, existe cierta dualidad en estos modelos ya que muchas otras propiedades de los astrocitos no son compartidas por la astrogliá de los modelos *in vitro* (Kimelberg y cols., 2000).

Dado que el fenotipo celular está profundamente determinado por la expresión génica, una buena aproximación para simplificar el problema de la validación del modelo consistiría en reducirlo al análisis de la expresión génica. Uno de los estudios más importantes a este respecto (Cahoy y cols., 2008) demostró, mediante el estudio del transcriptoma en astrocitos en cultivo e *in vivo*, que ambos comparten un perfil similar de expresión génica, a pesar de que algunos de los genes fueron expresados en astrocitos en cultivo y no *in vivo* y viceversa. Esto refleja en términos de la expresión génica lo que ya se sabe en otros términos: los astrocitos en cultivo son similares pero no idénticos a los astrocitos *in vivo*. Por tanto es necesario validar uno por uno cada estudio

de este tipo.

Las diferencias entre los modelos astrocitarios *in vivo* e *in vitro* pueden proceder de distintas fuentes. Una de las principales razones es la exposición a un microambiente celular distinto al que se da *in vivo*. Pero no es la única. Otro de los orígenes de estas diferencias es el sesgo que se introduce en los cultivos por la mayor representación de aquellas poblaciones más proliferativas. Esto, unido a que se parte de tejido temprano, llevaría teóricamente a una mayor representación de poblaciones de progenitores astrocitarios, que haría que los cultivos de astrocitos fuesen en realidad cultivos de astroblastos (Levison y McCarthy, 1991; Cahoy y cols., 2008). Una hipótesis alternativa a ésta es que los astrocitos en cultivo fuesen en realidad una forma de astrocito reactivo, aunque ciertos estudios parecen descartarla (Nakagawaa y Schwartz, 2004). En cualquier caso, los cultivos suponen un microambiente muy distinto al que se da en el cerebro, por lo que las propiedades que sean retenidas por la astroglia en cultivo deben ser fundamentalmente intrínsecas a las células. Por tanto, es razonable pensar que los cultivos son, sobre todo, la manifestación de las propiedades intrínsecas de la astroglia, poco dependientes por tanto del factor ambiental. Incluso aunque, como en nuestro caso se trate de células que por derivar de orígenes distintos pudieran crear un microambiente de cultivo distinto entre ellas, globalmente, ese microambiente no sería más que una manifestación de las propiedades intrínsecas de un conjunto de células. Por tanto, de validarse el modelo, esto permitirá obtener algunas conclusiones sobre la naturaleza intrínseca o extrínseca de las propiedades que se estudien.

B. LA ASTROGLÍA *IN VITRO* REPRODUCE LA PERMISIVIDAD DEL TEJIDO A LA MIGRACIÓN POR LA RMS.

Una de las primeras conclusiones que se puede obtener tras observar los co-cultivos de explantes de RMS sobre astroglia es que los astrocitos suponen un sustrato bastante eficaz para la migración de este tipo de neuroblastos (**Figura 45**). Esto es algo que no parece ser artefactual del modelo *in vitro*, ya que muchas evidencias *in vivo* sugieren que las poblaciones astrogliales soportan perfectamente la migración de progenitores.

Uno de las evidencias de esta función de soporte en la migración se refleja en el hecho de que la glía radial es un sustrato perfecto para la migración de progenitores neuronales a lo largo de sus procesos (Rakic, 1972). Como se ha descrito en otros apartados (ver introducción), esta glía radial se transforma postnatalmente en astrocitos, los cuales no tendrían por qué perder esta propiedad. Esta función de la astroglia como promotora de migración, podría reflejarse en las grandes densidades de astroglia que rodean la migración de neuroblastos tanto en RMS como BO (Emsley y Macklis, 2006). Otro hecho que apunta en este sentido es que la migración a través del BO y la RMS mantiene una estrecha relación con los vasos sanguíneos (Bovetti y cols., 2007b), lo cual podría ser simplemente el reflejo de la presencia de abundantes pies chupadores astrocitarios. Asimismo, los astrocitos son unos de los grandes productores de matriz extracelular

la cual tiene una gran implicación en el proceso migratorio. Por tanto, esta capacidad para soportar la migración neuronal es una de las propiedades que los cultivos astrogiales parecen reflejar perfectamente.

La eficacia de la migración, sin embargo, está sometida a las límites que impone la heterogeneidad astrocitaria. Como demuestran nuestros resultados, aquellas poblaciones derivadas de regiones permisivas a la migración *in vivo*, soportan muy eficazmente dicha migración *in vitro*, lo contrario de lo que sucede

sobre monocapas de astrogía cortical, donde la migración es muy escasa. Pero además, la astrogía cortical no es única en esto ya que se comportan de forma muy similar otras regiones adyacentes a la migración (no permisivas *in vivo*). Esto es muy importante ya que refuerza la validez del modelo debido a que es más difícil que en ambos casos se dé por casualidad un soporte tan escaso de la migración. Además, las diferencias observadas en uno y otro caso podrían ser mucho más acentuadas debido a que como indica la **Figura 67**, la inevitable presencia de astrocitos de RMS en los explantes podría estar enturbiando los datos para las regiones no permisivas. De hecho, es muy probable que la migración sobre monocapas corticales y de otras regiones no permisivas fuese mucho menor sin la presencia de estos astrocitos permisivos, que podrían actuar promoviendo por contacto la salida de los neuroblastos.

Esta heterogeneidad entre las distintas poblaciones astrogiales en relación con el soporte migratorio no constituye su única diferencia, ya que también se ha demostrado la existencia de diferentes morfologías entre las células astrogiales procedentes de distintos orígenes. Mientras la glía de RMS y BO mostraron formas fusiformes, la morfología de la astrogía cortical fue la típica descrita para astrocitos de tipo I, con somas poligonales y cierta apariencia estrellada.

La morfología astrogial en cultivo ha sido un parámetro poco estudiado debido a su variabilidad, siendo dependiente de entre otros factores, de la densidad del cultivo (Levison y McCarthy, 1991). Así pues, la mayor densidad celular tiende a favorecer el desarrollo de células con uno o más procesos gruesos, mientras que una menor densidad tiende a favorecer células más grandes y extendidas. A pesar de que esto podría parecer a simple vista una explicación para las diferencias mostradas en este trabajo, hay varias razones por las que esto no es así. Por un lado, aunque es cierto que la astrogía de la RMS suele aparecer a mayores densidades debido a su gran capacidad proliferativa, lo cual correlaciona con su morfología fusiforme, la astrogía bulbar tiene esta morfología aunque suelen ser los cultivos menos densos. Además, varios experimentos en los que analizamos células con densidades celulares parecidas (sembrando las de RMS a menor densidad) mostraron los mismos resultados.

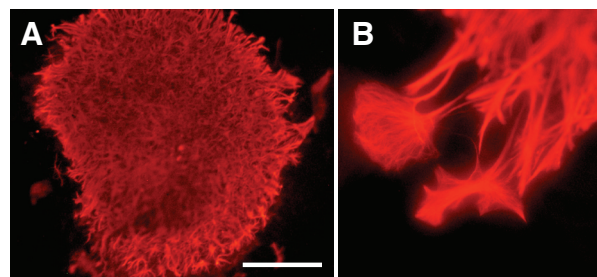


Figura 67. Presencia de astrocitos en los explantes de RMS. A. Baja magnificación de uno de los explantes de RMS utilizado en cultivo, inmunomarcado con GFAP. **B.** Imágen a alta magnificación de los astrocitos presentes en el explante de RMS.

Estas diferencias morfológicas también parecen un reflejo de lo que ocurre *in vivo*. Así pues, como muestran los datos obtenidos con Star Track, tanto en BO como sobre todo en RMS, se observaron múltiples células radiales no presentes en las capas corticales. Esta relación entre la morfología *in vitro* e *in vivo* sugiere que ciertos rasgos morfológicos groseros son intrínsecos a la célula y no viéndose muy modificados por el microambiente celular.

C. FACTORES IMPLICADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENCIAS MIGRATORIAS

En nuestro modelo *in vitro* parece razonable pensar que los factores que determinan la capacidad de soporte migratorio solo pueden ser de dos tipos: celular y molecular. El análisis de la dinámica migratoria sobre las distintas monocapas reveló importantes resultados sobre la naturaleza de los factores a nivel celular. En primer lugar permitió descartar la posibilidad de que las diferencias en migración se debieran a mayor proliferación de neuroblastos, ya que en las 90 células analizadas, no se observó ni una sola mitosis. Del mismo modo, demostramos que los neuroblastos migran más rápidamente y con periodos estacionarios más cortos sobre monocapas astrogiales de BO en comparación con aquellas de Cx. Además, en el resto de comparativas se observó una tendencia no significativa que encaja con las diferencias en índice de migración estudiadas en condiciones no dinámicas. Así pues, tanto la velocidad media, que resultó similar a la observada *in vivo* para estos neuroblastos (Nam et al., 2007) como el desplazamiento neto, fue mayor sobre monocapas de RMS en comparación con las corticales. Lo contrario ocurrió con los periodos estacionarios. No obstante, las razones para no haber encontrado diferencias significativas estadísticamente parecen claras. Por un lado, parece que cada uno de los índices por separado participa escuetamente en la determinación de las diferencias, pero en su conjunto producen grandes diferencias. Por otra parte, *in vivo* existe una importante variabilidad en la motilidad de los distintos neuroblastos, que ha llevado incluso a clasificarlos en distintas clases en función de sus trayectorias y velocidad (Nam y cols., 2007). Esta gran variabilidad podría actuar enmascarando las pequeñas diferencias significativas.

Por otra parte, nuestros datos también demostraron que la dinámica migratoria cambia con el tiempo tanto en los cultivos de RMS como de Cx, pero no para BO. Así pues, tanto en RMS como en Cx se produce un aumento progresivo de la media de células paradas, lo cual hace que la media de la distancia al origen de partida de cada célula se sature alrededor de los 200 minutos de cultivo. Sin duda alguna, esto implica un mayor tiempo medio de periodos estacionarios en Cx y por consiguiente, una menor velocidad media. Este cambio de la dinámica migratoria también ocurre en rodajas de cerebro donde existe una reducción de la velocidad de migración de las células en la RMS respecto al tiempo, que concuerda con el aumento que vemos en periodos estacionarios (Figura 1C en Bovetti y cols., 2007a). Este cambio temporal en la dinámica migratoria podría estar reflejando algunos aspectos sobre la naturaleza a nivel molecular de los factores que

determinan las diferencias migratorias. De hecho es razonable pensar que se trate de factores que se agoten o se degraden en RMS y Cx pero no en BO, quizá por una mayor concentración. Otra explicación sería que en RMS y Cx los neuroblastos sean más dependientes de algún factor liberado por el explante. De no ser así, costaría explicar que las células comiencen a pararse más en unos casos pero no en otros.

También a nivel celular, la correlación entre la morfología celular y la capacidad de soporte a la migración podría sugerir que existe una relación causal entre ambos factores. De este modo, podría darse el caso que los largos procesos radiales permitiesen que las células los usasen como raíles de modo similar a lo que ocurre *in vivo* con la glía radial. Sin embargo, el análisis de los videos sobre las trayectorias migratorias parece descartar esta posibilidad ya que el paso de una célula a otra no parece un limitante al no producir periodos estacionarios y tampoco se observa una preferencia clara por migraciones siguiendo procesos radiales. Por tanto, la morfología no parece un factor celular que determine las diferencias migratorias. Más bien parece que o bien se trata de una correlación casual o bien está mediada por una covariable como el estado de diferenciación.

Como se ha explicado en las consideraciones previas, los cultivos astrogiales están expuestos al sesgo de la mayor representación de poblaciones más proliferativas como los progenitores astrogiales. Debido a que la migración sucede también durante la primera semana postnatal (pico de neurogénesis), es razonable pensar que *in vivo*, incluso las poblaciones astrogiales inmaduras ya poseen las propiedades de soporte y/o restricción de la migración. Por tanto, una posible mayor representación de astroglia inmadura en los cultivos podría reflejar lo que ocurre durante el pico de la neurogénesis y no tendría que ser un impedimento para la validez este modelo. Sin embargo no podemos descartar que el estado de diferenciación fuese distinto entre las distintas monocapas y que además actuase como la covariable mencionada anteriormente. De hecho, la mayor proliferación que se produce en las monocapas de RMS puede reflejar un estadio más inmaduro de diferenciación. Además, en las monocapas de BO, la inmunocitoquímica mostraba una menor expresión de GFAP, considerado como un marcador de diferenciación ya que reemplaza a la vimentina como filamento intermedio a medida que las células maduran tanto *in vitro* como *in vivo* (Levison y McCarthy, 1991). Asimismo, ambas monocapas presentan una morfología fusiforme con escasos procesos que podría también reflejar un estadio de inmadurez. Aunque se hace necesario un análisis más profundo con otros marcadores para poder obtener conclusiones, no podemos descartar por tanto que la permisividad de la astroglia *in vitro* esté estrechamente relacionada con el estado de diferenciación celular.

A nivel molecular, nuestros resultados aportan importantes conclusiones sobre la naturaleza de los factores que están detrás de la capacidad de la astroglia de soporte de la migración. Una de las más importantes, sin lugar a dudas, es que estos factores actúan asociados a la superficie celular/matriz extracelular. Además, no hemos encontrado factores astrogiales difusibles que afecten a la migración al contrario que lo descrito previamente (Mason y cols., 2001). Esta diferencia puede

ser explicada por múltiples razones. Por un lado, Mason y cols. (2001) utilizaron otros sustratos que podrían facilitar la aparición de las diferencias en migración entre la presencia y la ausencia de astroglia. Por otra parte, el modelo animal fue distinto ya que ellos utilizaron explantes de rata. Aún así, tanto su estudio como el nuestro podría estar obviando factores difusibles que requieran una concentración crítica (que existiría *in vivo*) para llevar a cabo su acción. En todo caso, aunque no descartamos la posible liberación por parte de la astroglia de factores difusibles que impacten en la migración, éstos no determinarían las diferencias en migración observadas ya que los cultivos de tipo contacto resultaron reveladores en este sentido. Incluso en presencia del mismo medio de cultivo, el soporte a la migración fue distinto. Esto resultó así incluso en experimentos en los que el explante se situó en la interfase entre dos monocapas de distinto origen, lo cual descarta que hubiera factores moleculares determinantes de corta difusión ya que estos serían compartidos en ambas monocapas separadas por unos pocos micrómetros. Aún así podrían existir factores de más corta difusión, si bien, de ser así, en la práctica se comportarían como factores de contacto asociados a la superficie celular/matriz extracelular.

Hasta aquí el retrato robot de los factores moleculares determinando las diferencias migratorias es claro: actúan por un mecanismo de contacto y su regulación, de tratarse de los mismos factores que actúan *in vivo*, parece poco sujeta al efecto del microambiente ya que sigue manifestándose incluso en un microambiente muy distinto. Con la intención de acercarnos un poco más al perfil general de expresión de factores que actúan por contacto y potencialmente relacionados con la migración, se analizó mediante RT-PCR cuantitativa parte del transcriptoma de este tipo. Nuestros resultados demostraron que existe una sobreexpresión general de genes que codifican para proteínas de matriz extracelular y adhesión celular tanto en monocapas de la BO como de RMS, en comparación con aquellas de Cx. El análisis uno por uno de estos genes mostró que en su mayoría, su expresión relativa fue muy similar en orden de magnitud a la demostrada en otros trabajos (Cahoy y cols., 2008).

Muchos de los genes en los que se ha demostrado una sobreexpresión en astroglia de BO y RMS, han sido relacionados previamente con el soporte de esta migración *in vivo*. Un ejemplo de ello son las lamininas, implicadas en esta migración actuando a través de integrinas en la formación de cadenas migratorias (Belvindrah y cols., 2007; Murase y Horwitz, 2002). Precisamente la integrina $\beta 1$, que aparece expresada en la RMS durante el pico de neurogénesis y está implicada en la formación de cadenas, producción de protusiones y traslocación celular (Belvindrah y cols., 2007), apareció sobreexpresada tanto en BO como RMS. Ésta proteína transmembranal, podría ser clave en la recepción de las señales procedentes de las lamininas de la matriz extracelular, originando una respuesta migratoria. Pero existen otras familias de proteínas de matriz extracelular que aparecen sobreexpresadas en nuestro análisis y que han sido implicadas con esta migración *in vivo*. Este es el caso de los colágenos, cuya expresión en la RMS sugiere una función en la migración como elementos estructurales y regulatorios (Eagleson y cols., 1996). Otra de las proteínas de este tipo es Sparc, expresado en la RMS (Vincent y cols., 2008) y sobreexpresado en los cultivos de

astroglía de RMS respecto a la cortical. Del mismo modo, también aparecen sobreexpresados en BO y RMS respecto a Cx los genes *Ecm1* y *Thbs1*. Mientras que la función de *Ecm1* es bastante desconocida y no ha sido relacionada con la migración de neuroblastos, la falta de *Thbs1* produce un ensanchamiento en la RMS, posiblemente consecuencia de un problema en la migración que frena a los neuroblastos en su migración a las capas bulbares (Blake y cols., 2008).

Una de las familias implicadas en la migración y que aparece sobreexpresada en nuestros cultivos son las metaloproteasas, enzimas que actúan degradando matriz extracelular y de este modo favorecen la migración al romper barreras de matriz extracelular que impiden el movimiento celular (Nakagawa et al., 1996; Deryugina et al., 1997). En nuestros análisis, varios miembros de esta familia, *Mmp-2*, *9*, *10*, *14* y *15*, aparecen sobreexpresados en BO, RMS o ambos. Bovetti y cols. (2007) demostraron que en este sistema de migración se expresan tanto *Mmp-2* como *Mmp-9* y que el tratamiento con inhibidores generales de este tipo de enzimas reducía la velocidad de migración de los neuroblastos cuando migraban individualmente pero no en cadena. A esta acción también hay que añadirle el efecto de los inhibidores endógenos como el *Timp2*, el cual además de expresarse en SVZ/RMS/BO (Bovetti y cols., 2007) también aparece sobreexpresado en los cultivos de astroglía de RMS. Este factor actúa inhibiendo tanto *Mmp-2* como *Mmp-9*, aunque su acción puede ser dual ya que, por ejemplo, la activación de *Mmp-2* también requiere de este factor (Murphy y Knauper, 1997). Además, las metaloproteasas pueden influir en la migración a través de la activación de integrinas (Bjorklund y Koivunen, 2005). Otra de las familias de metaloproteasas estudiada fue la de los Adamts, cuyos miembros 1 y 2 difieren significativamente en nuestros cultivos. Mientras que *Adamts-1* fue sobreexpresado en RMS respecto a Cx, *Adamts-2* fue más expresado en Cx respecto a BO y RMS. A pesar del papel que se le ha atribuido a este gen en la migración por la RMS (Murase y cols., 2008), su mayor expresión en Cx no encaja con esa idea, si bien, debido a que esos datos proceden de experimentos en knock-out no condicionales y con falta de expresión ubicua, el mecanismo por el que *Adamts-2* afecta a la migración podría tener que ver con otros tipos celulares o con la interferencia en procesos de desarrollo temprano. En cualquier caso, el papel del sistema de metaloproteasas y sus inhibidores es muy complejo y parece requerir un estrecho equilibrio entre la digestión de las barreras de matriz extracelular y la conservación de una estructura de matriz extracelular como soporte de la migración.

Otro de los sistemas que podrían estar relacionados con las diferencias en migración observadas es el de las cadherinas/cateninas. Este sistema es esencial en múltiples procesos relacionados con la adherencia celular como morfogénesis de tejidos, organización celular, formación y mantenimiento de barreras, migración celular, etc. (revisado en Halbleib y Nelson, 2006). Aunque pueden funcionar de manera independiente a través de otras señales o efectores, su interacción más estudiada se basa en que las cadherinas, que son proteínas de membrana, responderían a señales de la matriz extracelular o a la interacción con otras cadherinas mediante la activación de las cateninas, las cuales activarían respuestas transcripcionales y del citoesqueleto. De sus miembros, algunos estuvieron sobreexpresados en BO, RMS o ambos, respecto a Cx. Este fue el

caso de la *Cdh2*, *Ctnna1* y *Ctnnb1*, sobreexpresados en BO y RMS o el de la *Cdh4*, sobreexpresada en RMS respecto a Cx. Aunque el papel de este sistema es algo más desconocido en esta migración, precisamente la *Cdh2* o *N-cadherina* es expresada tanto en SVZ como RMS (Yagita y cols., 2009). Además, su implicación en otros modelos de migración parece clara (Taniguchi y cols., 2006).

De todos estos factores, solamente algunos estuvieron sobreexpresados en las monocapas de astroglia cortical. Curiosamente, todos ellos caen en la clasificación de baja expresión, lo cual nos hizo dudar de su importancia relativa a las diferencias observadas en la migración. Si bien es cierto que la concentración crítica a la que actúa cada factor puede variar mucho entre los distintos factores, los factores menos expresados podrían, o bien estar por debajo de su concentración crítica o corresponder a genes expresados en ese porcentaje de células no astrocitarias (aproximadamente un 8%) presentes en nuestros cultivos. Por tanto, los escasos genes con sobreexpresión cortical no parecen ser decisivos en las diferencias en migración que observamos en nuestros cultivos.

En conjunto, estos datos indicaron que es probable que varios de los factores estudiados cumplan una función en la migración también *in vivo*, por lo que intentamos acercarnos más a algunos de ellos. El razonamiento previo de este análisis fue que si alguno de estos factores fuera determinante para la migración por la RMS, su expresión total tendría que ser diferencial en zonas permisivas y no permisivas. Debido a la gran cantidad de factores estudiados, decidimos elegir solamente algunos de ellos en base a varias preferencias previas. En primer lugar decidimos analizar aquellos genes con grandes diferencias entre las monocapas. Dentro de éstos y siguiendo el razonamiento descrito previamente, optamos principal pero no exclusivamente por genes con una gran concentración en nuestros cultivos. Por último, en un intento de simplificar el análisis, elegimos principalmente factores con sobreexpresión en ambos, BO y RMS respecto a Cx. Esto hizo que seleccionásemos *Thbs1*, *Sparc*, *Emc1*, *Ctnna1*, *Lama3* y *Cdh2*. El análisis de la expresión de estos genes nos mostró que, como era de esperar, algunos de ellos también estaban sobreexpresados en BO y RMS, mientras la expresión de otros no encajaba con los resultados *in vitro*.

Basado en su patrón de expresión *in vitro* e *in vivo* y en su papel en la migración (Blake y cols., 2008), la *Thbs1* parece ser fundamental en las diferencias de migración observadas. A pesar de que otros autores no han encontrado que sea muy expresada por astrocitos *in vivo* (Cahoy y cols., 2008), esto podría deberse o bien a que su fuente *in vivo* no es astrogliar o a que no utilizaron astrocitos de SVZ, RMS o BO. Por otra parte, su inhibición *in vitro* mediante shRNA produjo la muerte de los astrocitos en cultivo, lo cual impidió analizar su efecto mediante una aproximación de pérdida de función *in vitro* (**Figura 68**). Asimismo, debido a que en este trabajo se utilizó tejido total (con otros tipos celulares), estos datos preliminares tendrán que ser completados en futuros estudios para conocer exactamente la contribución de la astroglia a los patrones de expresión *in vivo* de la *Thbs1* y otros de factores adicionales.

Con todo, y a falta de estudios que focalicen en la contribución astrogliar a la expresión *in vivo* de los genes a los que se apuntan en este trabajo y probablemente de muchos otros genes, nuestros resultados han demostrado que la astroglia de BO y RMS soporta muy eficazmente la migración

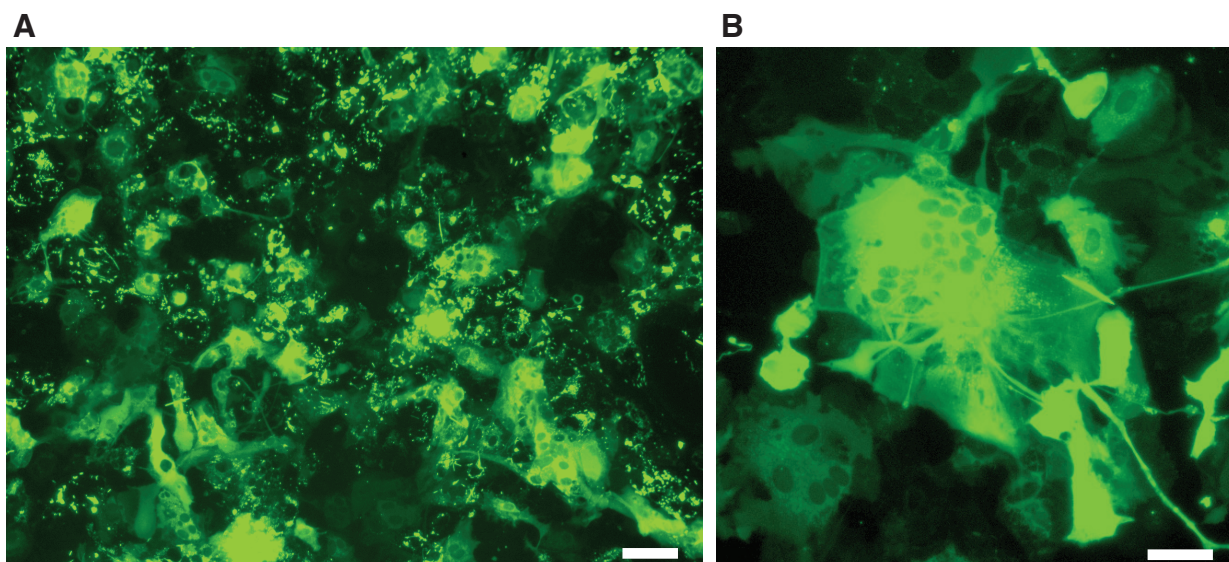


Figura 68. La inhibición de la Thbs1 mediante shRNA produce polinucleación astrocitaria y muerte celular. **A.** Baja magnificación de un cultivo nucleofectado con un shRNA para Thbs1. Como control de la nucleofección se añadió un plásmido para la expresión de GFP. Las células verdes tienen por tanto una altísima probabilidad de contener dicho shRNA. **B.** Alta magnificación de una de estas células. Escala = 50 μm en A; 20 μm en B.

de neuroblastos de RMS en comparación con la astroglia cortical. No obstante, al igual que no se puede definir si un sistema de referencia está en movimiento constante o en reposo, parece imposible definir si las diferencias se deben a un efecto activo promotor de la migración por parte de la astroglia de BO y RMS o a un efecto activo inhibidor de la migración por la astroglia cortical y de otras regiones adyacentes.

En todo caso, estas diferencias parecen deberse a una sobreexpresión generalizada de factores moleculares de matriz extracelular y adhesión celular, que hace poco eficaz cualquier análisis reduccionista de ganancia o pérdida de función, ya que el efecto total parece deberse a múltiples factores moleculares de pequeño efecto en el que su asociación a las células resulta fundamental. Además, cada uno de estos factores participa como nodos de redes de interacciones entre ellos, lo cual requiere un mayor desarrollo de la metodología actual de análisis de expresión génica y sus implicaciones. Asimismo, la parte molecular de este trabajo constituye únicamente una primera aproximación ya que al tratarse de un estudio mediante RT-PCR, el análisis se restringe al nivel de mRNA y no de proteína, las principales efectoras de cualquier respuesta celular.

II. HETEROGENEIDAD INTRÍNSECA DE LAS POBLACIONES ASTROCITARIAS *IN VIVO*

Siguiendo con los razonamientos anteriores, la heterogeneidad astrocitaria podría ser dividida en dos componentes: heterogeneidad extrínseca y heterogeneidad intrínseca. Mientras que la heterogeneidad extrínseca correspondería a diferencias entre poblaciones astrocitarias cuya causa es la exposición a un microambiente celular distinto, la heterogeneidad intrínseca reflejaría

aquellas diferencias que vienen marcadas por el desarrollo y que sujetas a cambios ambientales. En general, la mayor parte de las propiedades astrocitarias que se suelen analizar corresponderían a la manifestación de ambos tipos de componentes. Sin embargo, estas propiedades podrían teóricamente fraccionarse hasta alcanzar el nivel extrínseco e intrínseco indivisible.

Casi por definición, la parte intrínseca de la heterogeneidad deriva de los distintos procesos de desarrollo que sufre cada población astrogliar diferente. Así pues, como si de un estudio con gemelos monocigotos se tratase, es razonable pensar que aquellas células del mismo tipo serán más parecidas entre sí en sus propiedades intrínsecas cuánto más cercanas se encuentren en la rama del linaje de la que deriven. Esto es, por ejemplo, lo que sucede en la diversidad de fenotipos de interneuronas que se producen dependiendo de la ubicación de su progenitor en las regiones proliferativas, incluso entre áreas muy cercanas. Esto implica que los progenitores son heterogéneos y que cada interneurona se parece más a sus hermanas que al resto de interneuronas. Por tanto, el estudio de cómo se manifiestan las distintas propiedades astrocitarias en poblaciones clonales expuestas a distintos microambientes se revela fundamental para conocer qué diferencias entre astrocitos son intrínsecas a la célula y cuales dependen del ambiente. O dicho de otro modo, para conocer qué papel tiene el desarrollo en el establecimiento de heterogeneidad astrogliar.

A. STAR TRACK COMO MÉTODO DE ANÁLISIS CLONAL *IN VIVO*

Debido a la escasez de métodos de análisis clonal *in vivo* para astrocitos y a la poca eficacia de los que existen, decidimos construir una nueva herramienta que permitiese seguir el linaje celular astrocitario en el cerebro. Así pues, ideamos una aproximación para generar marcas específicas heredables en los progenitores, que al dividirse expandirían la población de células con esa marca específica. Esta aproximación se basó en la electroporación con vectores que codifican para proteínas seis proteínas fluorescentes distintas, expresadas en núcleo y citoplasma. Su nombre, Star Track se traduciría como rastro de las estrellas o de los astros.

Al igual que ocurre con otras metodologías de análisis clonal que usan promotores específicos, Star Track debiera clasificarse como una mezcla entre retrospectivo y prospectivo. Es decir, se podría considerarse prospectivo ya que debido al uso del promotor de GFAP conocemos algo sobre las células que se van a marcar. Pero dentro de que sean astrocitos, no podemos determinar ni qué células se van a marcar ni siquiera qué tipo de astrocitos. Por tanto, con la primera salvedad, Star Track debiera considerarse y clasificarse como un método retrospectivo.

Una de las primeras preguntas que pueden surgir sobre este método es cuál es el número máximo de marcas diferentes que se pueden conseguir. A este respecto, hay que decir que la marca puede ser distinta en dos sentidos: cualitativo o cuantitativo. Mientras las diferencias cualitativas se refieren a la expresión o no expresión de una determinada proteína fluorescente en una ubicación concreta, las diferencias cuantitativas se refieren a aquellas que se dan entre dos células con la expresión de las mismas proteínas fluorescentes en las mismas ubicaciones pero en

distinta cantidad. Mientras que las primeras son más fiables, puesto que están menos expuestas a pequeñas variaciones incontrolables de los niveles de transcripción y traducción, no hay que obviar la importancia de las segundas. De hecho, si no fuera por las diferencias cualitativas no tendrían ningún sentido los métodos que existen hasta ahora que trabajan con marcaje combinatorial como Brainbow o el marcaje RGB ya que al estar basados en la expresión de solo 4 elementos distintos, el número de combinaciones posibles es muy reducido.

Para el cálculo del número de marcas posibles, hay que tener en cuenta también que este parámetro es dependiente del número de copias del transposón que se integren. Aunque en este trabajo no se cuantificó el número de copias integradas, otros autores han descrito que se suelen integrar unas nueve copias. Sin embargo, este número es enormemente variable entre las células y además depende de la cantidad de transposasa que expresen y de los plásmidos que penetren en las células por electroporación. Además, su posible inserción en ciertas regiones genómicas podría impedir su transcripción, lo que para nosotros sería similar a que no se hubiera insertado. Por otra parte, un posible cálculo matemático tendría que ser corregido debido a que cuando una proteína se expresa en el citoplasma es difícil saber si también se está expresando la forma nuclear. En suma, debido a todo esto es muy difícil tener una idea aproximada del universo de posibles marcas, aunque sin dudas es enorme. Sin embargo, asumiendo que las células integren entre 5 y 12 copias, un sencillo cálculo matemático basado en las combinaciones (sin orden) y sin repetición apunta a un límite en el máximo de 3302 combinaciones cualitativamente distintas (suma del número de combinaciones sin orden y sin repetición de 12 elementos tomados en grupos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). No obstante, atendiendo a criterios cuantitativos, el número máximo de marcas posibles es teóricamente infinito, aunque en la práctica la variación intracelular de la marca imponga la resolución únicamente de diferencias cuantitativas groseramente distintas.

Las primeras imágenes de la utilización de Star Track nos han mostrado multitud de células con marcas, que analizadas canal por canal, fueron en su mayoría distintas. El análisis de la clonalidad de las muestras, nos llevo a definir varios factores muy importantes en relación con la precisión de Star Track. El primero de ellos fue la complejidad de la marca. Una proporción relativamente alta de células adquirieron una mezcla simple, difícil de resolver. Este es el caso, por ejemplo, de aquellas células que solamente adquirieron una o varias copias de uno de los fluoróforos expresado únicamente en citoplasma o núcleo. Esto hizo, que por la frecuencia de su marca, las células así marcadas no pudieron incluirse en el análisis. Otras células, con otros tipos de marcas frecuentes, fueron también excluidas del análisis. Por otra parte, el número total de células marcadas fue muy importante para la efectividad de Star Track. Cuando la electroporación marcó muchas células, frecuentemente no se obtuvieron resultados a nivel de clonalidad, aunque estos animales fueron muy útiles para obtener una visión general del proceso gliogénico. Otro de los factores que afectaron a la fiabilidad de Star Track fue la dispersión de las poblaciones clonales. Así pues, fue muy fácil saber si una población celular era clonal cuando se encontraban en grupos, pero no tanto cuando se encontraban dispersas. De hecho, algunos trabajos han utilizado el criterio

de proximidad entre células como necesario y suficiente para definir clonalidad. Por tanto, la efectividad de Star Track es óptima cuando se trata de células agrupadas, con una marca compleja y presentes en un cerebro con pocas células electroporadas.

Estas salvedad sobre la precisión de Star Track no impidieron, sin embargo, que Star Track se revele como uno de los métodos más precisos y más potentes de análisis clonal para astrocitos *in vivo*. De hecho, el método más utilizado para trazar linajes, la inyección con retrovirus, posee muchos inconvenientes como son el silenciamiento, el sesgo por la infección únicamente de células en división, el marcaje de una sola de las dos células hijas y los errores de splitting/lumping. Todos estos inconvenientes son eficazmente evitados por Star Track. Por un lado, debido a que nuestros vectores poseen promotores no víricos, la expresión de las proteínas fluorescentes no es susceptible de silenciamiento epigenético (Costa y cols., 2009). Además, debido a que las marcas analizadas en las células son bastante complejas, incluso el silenciamiento de alguna de las copias no afectaría, ya que si dos células comparten 7 de las variables fluorescentes expresándose en la misma cantidad pero difieren en una de ellas, se puede excluir del análisis por su carácter dudoso, evitando así cometer un error. Estas mismas marcas complejas hacen muy difícil los errores de lumping y splitting (ver introducción) ya que por su rareza, es casi imposible que dos marcas complejas se repitan en eventos independientes de electroporación en el mismo animal. Además, aunque hay cierta preferencia por el ciclo celular en la electroporación, no es muy importante y por tanto Star Track no es dependiente del ciclo celular. Asimismo, la electroporación marcaría ambas células aunque se estén dividiendo en ese momento ya que hasta que se produzca la citocinesis celular, ambas células se comportan como una única. Pero también resulta más eficaz que el método LaacZ (ver introducción), ya que este también es susceptible de errores de lumping y splitting por usar un único marcador. Además, el uso de animales es mucho mayor que con Star Track, ya que la probabilidad de que el evento de recombinación se produzca en un clon astrocitario es bastante baja. Por otra parte, también mejora otros métodos combinatoriales como el Flybow, el marcaje RGB o el MADM ya que estos trabajos usan un número máximo de 4 fluoróforos en la combinación, mientras que Star Track lo supera con 12 elementos fluorescentes combinables (6 en núcleo y 6 en citoplasma). El resto de métodos de análisis clonal no son comparables con Star Track por su rango de aplicabilidad, como por ejemplo el uso de proteínas fotoconvertibles, que al menos en condiciones de animal completo, solo puede utilizarse en organismos transparentes..

Pero Star Track tiene otras ventajas, como es el hecho de que no se requiera la generación de animales modificados genéticamente, lo que implica una drástica reducción en el número de animales utilizados para este tipo de análisis. Además, debido a que el número de plásmidos que se pueden incorporar en la electroporación parece infinito, versiones nuevas de esta metodología vendrán derivadas de la inclusión de nuevas proteínas fluorescentes o de nuevas ubicaciones para las ya existentes.

Otra de las ventajas de Star Track es la fácil adaptación a otros tipos celulares distintos a los astrocitos, aunque en este punto hay un concepto que aclarar. Star Track funciona en astrocitos

Problema de las copias episomales

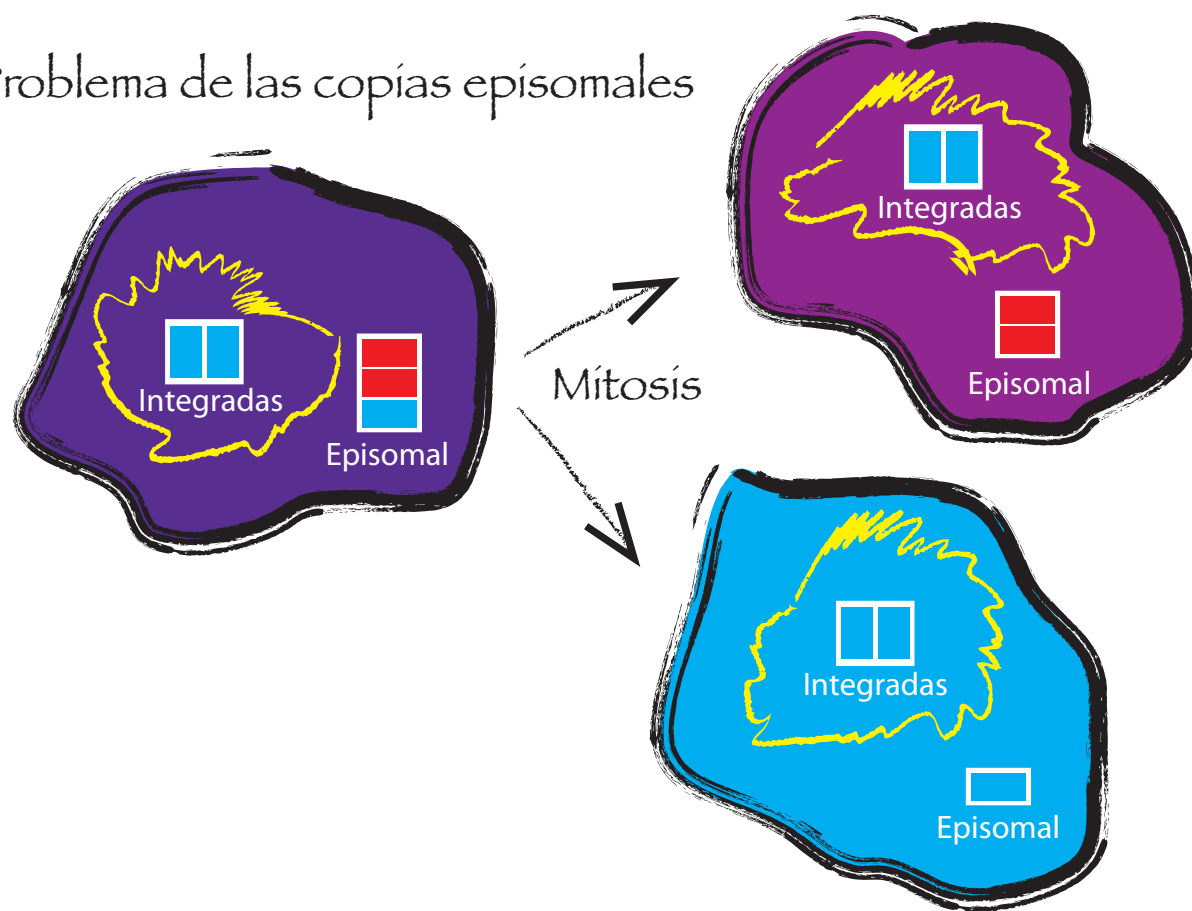


Figura 69. Esquema sobre el problema de la no dilución de los plásmidos episomales en otros fenotipos celulares.

porque explota el problema de la dilución del plásmido para conseguir que las marcas sean estables (**Figura 69**). Es decir, debido a que los astrocitos proceden de múltiples divisiones, los plásmidos se diluyen de modo que dejan de ser funcionales cuando las células se diferencian a astrocitos. Este fenómeno previamente descrito se ha constatado en nuestros experimentos. De este modo, el problema de la dilución actúa a nuestro favor, evitando que queden copias no integradas que podrían pasarse a las células hijas de modo asimétrico. Como ejemplo extremo, podemos pensar en una célula que tenga dos copias de plásmidos, una del rojo y otra del azul. Esa célula, que tendría un color morado, al dividirse produciría una célula roja y otra azul. Además, la dilución del plásmido en astrocitos permite que la transposasa deje de actuar, lo que sin duda haría que la marca no fuese estable. Esto que parece bastante lógico que ocurra, también lo hemos demostrado comparando la expresión cuando se utiliza transposasa normal con aquella que ocurre cuando se utiliza la forma inducible de la transposasa o cuando se coelectropora una forma flanqueada por sitios LoxP con un plásmido para la Cre recombinasa. Los patrones y el tamaño de los clones son muy similares.

Esta precaución ha llevado a que en el laboratorio hayamos diseñado formas de Star Track con promotor ubicuo que eliminan la posible expresión a partir de plásmidos no integrados mediante una estrategia de recombinación homóloga. Con esta modificación, Star Track se postula como un método de análisis clonal que va mucho más allá de los astrocitos y que se podrá utilizar en áreas de tal interés como el análisis de linaje en cáncer y células madre entre otras

B. DISPERSIÓN CLONAL DE LAS POBLACIONES ASTROCITARIAS

“Pero lo más interesante de estos tipos de pareja y cuadriga consiste en la posición del centrosoma. [...]. Semejante particularidad, característica, según es notorio, de todo corpúsculo resultante de reciente mitosis, prueba, á nuestro entender, que gemelos y cuádrigas constituyen la expresión anatómica de reciente segmentación.”. En cierta forma, podría decirse que ésta y otras descripciones de Cajal (1913) sobre ciertas agrupaciones de astrocitos, a los que él llamó grupos isogénicos, son los primeros estudios sobre clones de astrocitos.

Casi un siglo después y mediante la utilización de Star Track como método de análisis clonal, nuestros resultados han mostrado el patrón de dispersión de los linajes astrocitarios en tres regiones de gran interés: corteza cerebral, RMS y BO. A pesar de que no hemos trazado un mapa temporal, este patrón de dispersión comienza con la migración temprana de progenitores gliales que alcanzan las regiones de destino tan temprano, al menos, como E18. Precisamente a esta edad, este patrón está caracterizado por la presencia de células con grandes somas y procesos citoplásmicos poco ramificados que incluso ya habían experimentado las primeras divisiones celulares, generando los primeros protoclonos de células astrogliales. Estos clones, que comienzan a situarse en las regiones que ocuparán en adulto, conviven con la presencia de glía radial, glía radial en transformación y otros tipos celulares que no siendo astrogliales, retienen un escaso marcaje debido a la vida media de las proteínas fluorescentes. Esta vida media es del orden de un día para el GFP y algo mayor para las proteínas rojas. Esto apuntaría a que esas células que estamos viendo, principalmente neuronas de capa 2/3, se han generado cerca de E17 algo que encaja perfectamente con la bibliografía.

Aunque no ha sido el foco de este trabajo, estos datos sobre dispersión temprana revelan algunos aspectos interesantes sobre los progenitores astrogliales y su forma de división. Así pues, el hecho de que la edad de las electroporaciones entre E13 y E15 no haya modificado aparentemente los tamaños de los clones de astrocitos, apunta a que los progenitores astrogliales no abandonan las capas proliferativas, accesibles a la electroporación, hasta después de E15. De lo contrario se esperaría que el número de células por clon y/o el número total de células marcadas variase muy significativamente. Electroporaciones más tardías como en E16 o incluso E17 deberían aclarar más este punto. De hecho, algunos trabajos que han analizado la dispersión celular después de inyecciones de retrovirus en la SVZ de ratas P0/P1, hablan de la presencia de clones de astrocitos de entre 1 y 5 células (Zerlin y cols., 2004). Otro de los aspectos que demuestran nuestros resultados

sobre la dispersión clonal temprana, es el modo de expansión clonal. El análisis de los videos de cultivos de rodajas cerebrales apunta a que los clones (al menos los corticales) se producen siguiendo un patrón de divisiones simétricas. De este modo, los progenitores que alcanzan las regiones de destino comienzan a moverse de modo aparentemente aleatorio, parándose habitualmente en el momento de la mitosis, y produciendo de este modo dos células hijas que se siguen dividiendo. Esto hace que el tamaño de los clones crezca muy rápidamente y de forma exponencial. De hecho, hemos estimado que aunque variable, el ciclo celular de estos progenitores está entre 15 y 24 horas. Esto permitiría que en menos de 7 días se puedan producir incluso los clones más grandes que aparecen en la corteza cerebral.

Una vez que los progenitores parten de las zonas proliferativas, su migración, siguiendo la dirección de los procesos de glía radial, les lleva directamente a dispersarse en las regiones de destino. A nivel cortical, esta dispersión produce grandes clones que o bien ocupan tangencialmente la zona subpial o bien se extienden en forma de elipsoides de distinta orientación a través de una o varias capas corticales. Salvo la excepción de los clones subpiales, este patrón de dispersión es fundamentalmente muy similar al descrito por otros autores (Price y Thurlow, 1988; Luskin y cols., 1988; Grove y cols., 1993; Zerlin y cols., 2004), lo cual sirve también de validación de Star Track como método de análisis clonal. Sin embargo, la ausencia en estos trabajos de clones piales, que en nuestras manos fueron tremendamente abundantes, parece estar reflejando alguno de los limitantes de la inyección de retrovirus como método de análisis clonal.

Al contrario de lo que ocurre en corteza cerebral donde existen varios trabajos citados anteriormente que, aunque sin focalizar, describen la dispersión clonal de astrocitos, nuestros resultados en RMS son los primeros en desvelar cómo sucede el proceso de generación de los linajes astrocitarios en la ruta migratoria de neuroblastos. En esta región, que albergó en su día el ventrículo olfativo, la generación astrogliar parece ocurrir de forma más o menos organizada, con cada región del ventrículo aportando células para ese lado del tejido. Esta dispersión organizada desemboca en el aporte de células para las estructuras adyacentes a la RMS, y también para la propia RMS. Este análisis ha descrito la presencia mayoritaria de formas de astroglia aparentemente inmaduras que o bien forman pequeños clones o bien se disponen como células individuales. A este nivel resulta enigmático qué factores están detrás del mantenimiento de ese estado aparente de inmadurez. Además, la presencia de clones con células inmaduras muy cercanas, sugiere sugerir que esta región sigue siendo activa en la producción de fenotipos astrogliales.

Del mismo modo, este trabajo es el primero en describir el proceso de dispersión astrocitaria a nivel de BO. Al igual que en la RMS pero de forma más clara, la dispersión celular se produce siguiendo un patrón organizado, con cada lado del ventrículo aportando células para esa misma región del BO. Esto origina un patrón dispersivo desde el ventrículo olfativo hasta las capas más superficiales del bulbo, en el cual se puede encontrar una tremenda variedad morfológica astrocitaria. Aunque al contrario que las técnicas de inmunohistoquímica para GFAP utilizadas en la descripción de la morfología astrocitaria en BO (Bailey y Shipley, 1993; Chiu y Greer,

1996), Star Track permite el marcaje del cuerpo celular por completo, una observación general apuntó a la existencia de las distintas formas de astrocitos descritas previamente siguiendo un criterio morfológico. Éstas incluyeron astrocitos lineares, elongados, semicirculares, circulares y cuneiformes (Bailey y Shipley, 1993; Chiu y Greer, 1996) (ver introducción). Respecto a la clonalidad, lo normal fue observar que los clones de astrocitos se disponían sobre todo en una o dos capas. Esto pareció diferir respecto a la corteza, donde a pesar de que sus capas ocupan extensiones mayores, muchos de los clones atravesaron diversas capas. Además, el número de astrocitos por clon varió mucho entre aproximadamente 5 y 20 células y no pareció obvia otra relación entre la procedencia clonal y su morfología que la que derivada del hecho de que las células hermanas tendían a estar en las mismas capas. Un hecho relevante fue la presencia de clones de astrocitos con morfología velada o cuneiforme englobando generalmente uno o dos glomérulos olfativos. No obstante, algunos de ellos penetraban con sus procesos en el neuropilo glomerular. Como ha sido descrito previamente (Doucette, 1993; Blanchart y cols., 2011), la región de la capa nerviosa y glomerular está también ocupada por el aporte de células de glía envolvente desde la placoda olfativa. La confluencia de ambas poblaciones, esto es, astrocitos de origen central y glía envolvente procedente de la placoda, en la cual parece que la glía envolvente le da el relevo funcional a los astrocitos, hace cuestionarse si ambas ocupan localizaciones y funciones solapantes o si existe especialización entre ellas. En cualquier caso, lo que sí queda claro es que ambas forman parte de la glía limitans (Doucette, 1993). Por otra parte cabe resaltar la presencia en el BO de células con morfologías radiales y otras con procesos poco ramificados. Éstas sugieren que al menos, parte de las poblaciones astrogiales del BO se mantienen en un estado de inmadurez similar al que se da en la RMS. Esto podría ser debido a que por su menor tamaño, las distintas capas del BO se encuentran más cercanas que en el caso cortical a la región que ocupó el ventrículo olfativo y que en adulto ocupa la zona subependimaria, lo que podría inducir de algún modo dichos estados de inmadurez. Por último, cabe destacar la enigmática presencia de células no astrocitarias en grupos clonales de bastante más de un centenar de células. Debido a su tremenda abundancia en todas las capas del BO, estas células, que posiblemente son polidendrocitos NG2 positivos ya que como se ha visto anteriormente tienen ligeramente activado el promotor de GFAP utilizado en este trabajo (Matthias y cols., 2003), podrían cumplir una función muy importante en la función de esta estructura.

C. DOMINIOS CLONALES Y SU POSIBLE PAPEL EN LA FISIOLOGÍA DEL CEREBRO

Las repercusiones funcionales que pueden tener estas conformaciones clonales son tremendas, dependiendo principalmente de que las células hermanas compartan entre sí algún mecanismo molecular. De ser así, se establecerían dominios con diferencias cualitativas o cuantitativas en distintas funcionalidades dependiendo del gen o genes expresados diferencialmente. De hecho,

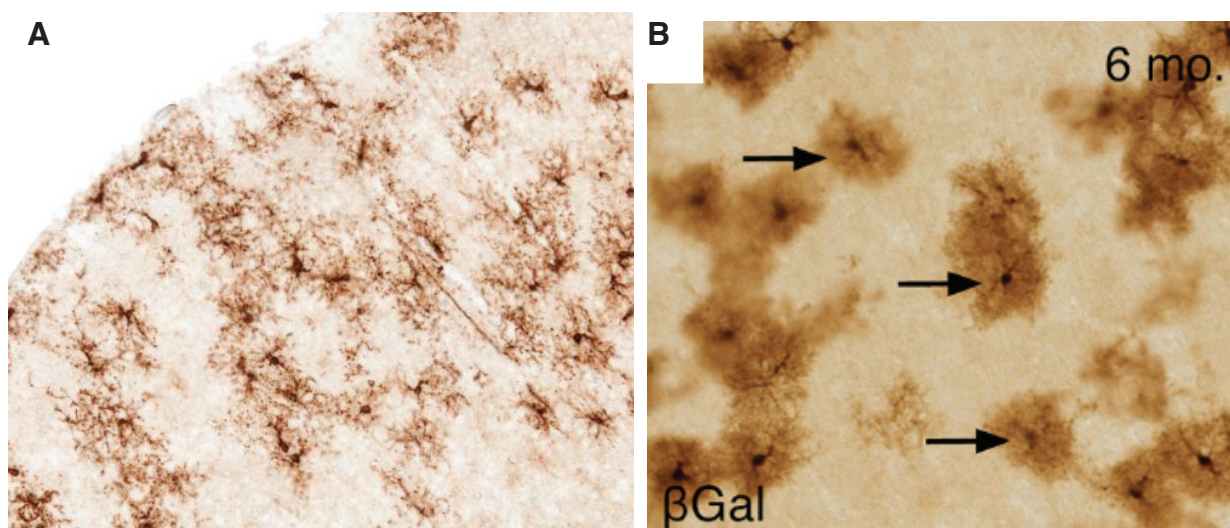


Figura 70. La expresión de Hes1 y Gli1 se produce en un patrón similar al de los clones astrocitarios. **A.** Expresión de GFP bajo promotor de Hes1 en un ratón BAC (Fuente: Gensat). **B.** Expresión de β -Gal bajo el promotor de Gli1 en un ratón knock-in (Fuente: García y cols., 2010).

estas diferencias a nivel molecular entre clones podrían derivar de que los clones retuviesen parte de la heterogeneidad ya descrita en los distintos progenitores a nivel de célula única (Kawaguchi y cols., 2008). Un estudio bibliográfico preliminar sobre patrones de expresión en astrocitos apuntan a varios genes como Gli1 (García y cols., 2010) o Hes1 (Gensat), que se expresan en patrones similares a los clones observados en nuestras preparaciones (**Figura 70**). Por tanto, si existe algún gen que difiera cualitativa o cuantitativamente esto podría determinar ciertas diferencias funcionales dependientes del clon.

En el caso de los glomérulos del bulbo olfativo, los clones astrocitarios que ocupan únicamente uno o varios glomérulos podrían participar como entidad unitaria en la organización axonal de los axones olfativos que están en un continuo recambio o en el procesamiento de la información olfativa, de la cual, los glomérulos constituyen su primera estación de relevo. Estos clones, actuando como entidad unitaria, podrían determinar el patrón de conectividad por uniones tipo GAP, caracterizado por una direccionalidad en las conexiones similar a lo que ocurre en los barriles de la corteza somatosensorial, en la cual los astrocitos del neuropilo glomerular están muy conectados entre sí, al igual que ocurre con las regiones interglomerulares. Sin embargo, la conexión entre esas regiones interglomerulares y el neuropilo es muy escasa. Esto, que se fundamenta principalmente en la expresión de distintas conexinas, podría participar en la restricción de la información olfativa a nivel glomerular. De tal modo, si en un futuro se demuestra que la expresión de las distintas formas de la conexina es clon dependiente, esto implicaría que la conformación clonal determina una parte del procesamiento de la información. Algo similar ocurriría con la organización axonal a este nivel, ya que quizá cada clon exprese una combinación de proteínas de matriz extracelular o adhesión celular que identifique esa región. De hecho, se ha demostrado que la proteína DsCAM en *Drosophila* tiene 38016 isoformas producidas por splicing alternativo y que esto podría ser un

mecanismo de identificación casi a nivel de célula única (Schmucker y cols., 2000). De ser así, estos astrocitos podrían actuar de forma similar a lo que ocurre en *Manduca sexta*, donde existe una población de células gliales que funcionan como organizadoras de la proyección axonal.

Este fenómeno también podría estar ocurriendo a nivel cortical con los grandes clones de astrocitos presentes en las distintas capas o a nivel bulbar, con los clones restringidos a una o dos capas. Al igual que las neuronas excitatorias hermanas establecen sinapsis preferentemente entre ellas (Yu y cols., 2009), podría suceder que los grupos de astrocitos presentes en corteza cerebral estuviesen conectados entre ellos, principalmente por uniones tipo Gap y/o sincronizados en sus oscilaciones de Ca^{2+} . Esto explicaría las elevaciones sincrónicas en la concentración de Ca^{2+} que ocurren entre pequeños grupos de astrocitos vecinos (Sasaki y cols., 2011). De hecho esto podría derivar tanto de la expresión de algún factor molecular como de los procesos de división celular que podrían mantener preferentemente conectados a aquellos astrocitos hermanos. Asimismo, a nivel cortical también hemos detectado la presencia no poco frecuente de clones astrocitarios localizados en torno a un mismo vaso sanguíneo, que de este modo mostraron un aspecto de columnas celulares. Esta organización es bastante enigmática ya que en la corteza cerebral la densidad de vasos sanguíneos es tremenda y sin embargo todos los miembros del mismo clon se distribuyen “eligiendo” el mismo vaso sanguíneo. Esto podría ser debido a que un progenitor alcance el vaso, se asocie a él y comience a dividirse únicamente en esa región aunque aun así sería difícil de explicar por qué ninguna de las células hijas se asocia a alguno de los vasos que se disponen transversalmente. Sea cual fuere el mecanismo por el que esto se produce, su posible implicación como entidad unitaria podría contribuir a formar dominios gliovasculares especializados, que reflejen como grupo alguna de las funciones vasculares de los astrocitos como la recaptura de sustancias o la modulación del tono vascular. De hecho, si un grupo de astrocitos responde a la actividad neuronal produciendo vasodilatación de un vaso sanguíneo como se ha visto que ocurre, la única forma de que esto sea efectivo es que se lleve a cabo de manera coordinada. De poco serviría que se vasodilate una región posterior del vaso si no lo hace la anterior que actuaría como un embudo. Los clones de astrocitos ocupando el mismo vaso podrían ser una respuesta a este problema. Si los astrocitos de un clon que ocupa un mismo vaso sanguíneo, responden conjuntamente a la actividad neuronal, porque estén más conectados a través de uniones Gap o porque expresen en mayor cantidad algún tipo de receptor, estos podrían aumentar el diámetro de ese vaso de manera coordinada y por tanto mucho más eficaz (**Figura 71**).

D. LINAJE CELULAR Y CLASIFICACIÓN ASTROCITARIA

A raíz de la clasificación clásica de astrocitos en protoplásmicos y fibrosos, se han descrito una pléyade de subtipos astrocitarios en base a diversos criterios de clasificación morfológicos, funcionales, de expresión génica o de localización, por lo que la comunidad científica no ha terminado de digerir y establecer tal clasificación como definitiva. Además en ocasiones éstas

Ejemplo sobre la posible función de los dominios clonales

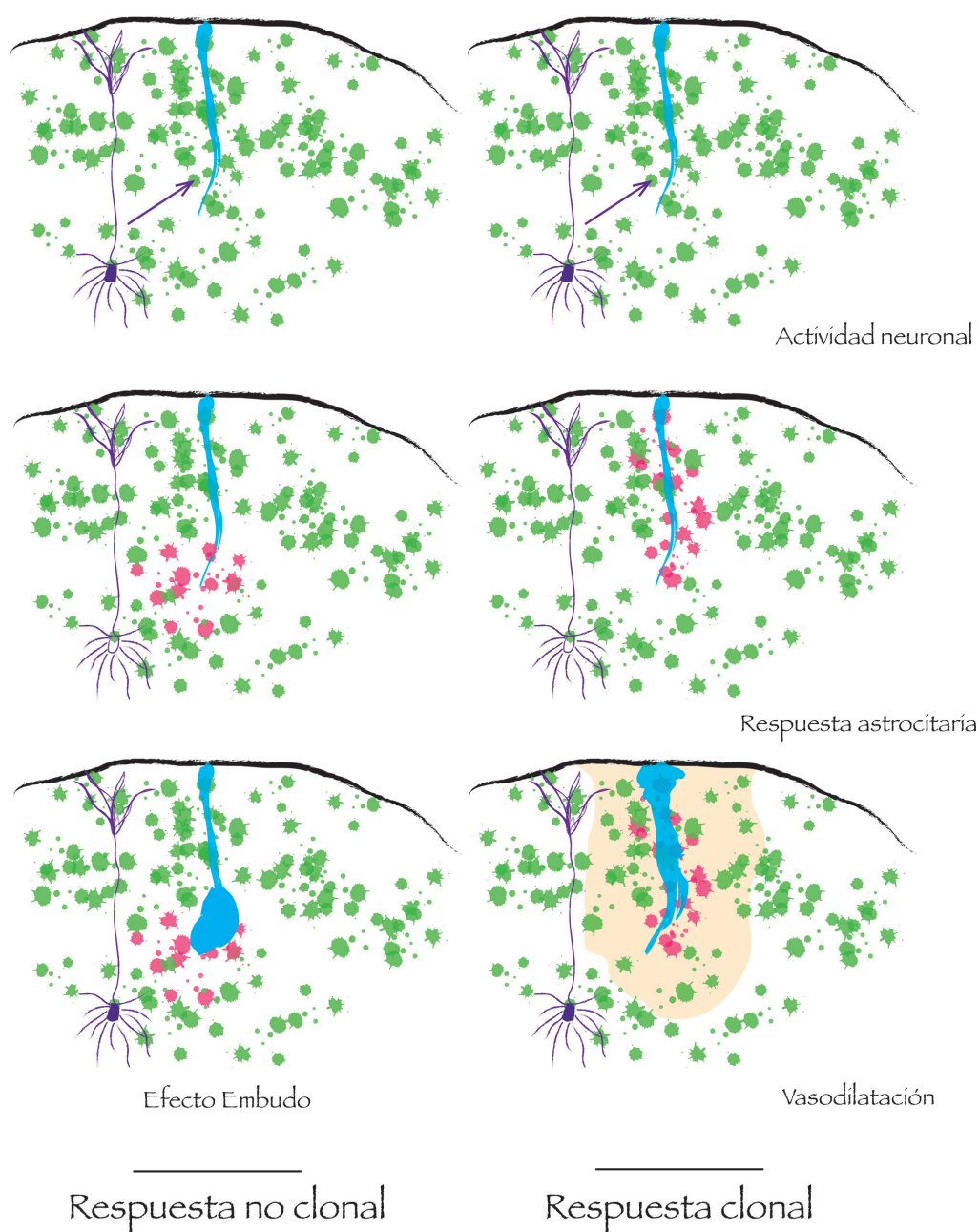


Figura 71. La posible importancia de una acción coordinada de astrocitos hermanos. En el caso de la respuesta no clonal, la actividad neuronal produciría una respuesta astrocitaria que desencadenaría la vasodilatación de únicamente parte del vaso. Esto produciría un efecto embudo que limitaría mucho las ventajas de esa vasodilatación. En el caso de la respuesta clonal, la actividad neuronal provoca que los astrocitos hermanos respondan a la vez y produzcan vasodilatación sincrónica a lo largo del vaso.

clasificaciones se basan en datos obtenidos a partir de modelos muy distintos y por tanto casi incomparables.

La clasificación razonable de cualquier objeto, celular o no, debiera basarse en diversos criterios discriminadores con distinto peso. Estos pueden llevar a una clasificación recurrente e innecesaria si hacemos (en un extremo) tantos subtipos como objetos, o imprecisa (en el otro extremo) si creamos un único saco donde se agrupen todos los objetos. Para un número determinado de subgrupos, la clasificación además puede ser errónea, si metemos en el mismo grupo a objetos distintos o en grupos distintos a distintas formas del mismo objeto. Por tanto, cualquier clasificación requiere en primer lugar el establecimiento de unos criterios claros de clasificación y el número de grupos y subgrupos que requieren las causas de la variabilidad entre los distintos objetos.

A nivel celular, una de las causas que más contribuyen a la creación de grupos innecesarios y/o a la clasificación errónea de distintas células es el desconocimiento de los factores intrínsecos y extrínsecos a las células. A veces, en base a las propiedades extrínsecas dependientes del ambiente, se clasifican como distintas dos manifestaciones del mismo fenotipo celular en distintos microambientes. Por tanto y ya que las propiedades intrínsecas debieran tener un peso fundamental en la clasificación celular, el estudio de la parte intrínseca y extrínseca del fenotipo se revela como esencial para establecer una clasificación razonable de toda la variabilidad astrogial, que además se distribuye de forma casi continua y no categóricamente.

Como se ha expuesto en la introducción, la clasificación dicotómica en astrocitos protoplásmicos y fibrosos fue establecida entre el final del siglo XIX y principios del XX (Andriezen, 1893; Cajal, 1913). Debido a la ausencia de otras metodologías que no fueran las tinciones clásicas, esta clasificación fue establecida siguiendo un criterio de localización, reacción a la tinción y morfología, sin analizar si la heterogeneidad mostrada por las células en estos criterios fue intrínseca o se trató de los mismos tipos celulares en microambientes distintos. Posteriormente y en un intento de completar estos criterios se llegó al error de describir linajes (criterio intrínseco) comparando astrocitos protoplásmicos y fibrosos con los astrocitos tipo 1 y 2 descritos en cultivo (Miller y Raff, 1984; Miller y cols., 1989), lo cual es incomparable por muchas razones. Debido a que los astrocitos de tipo 2 derivan de progenitores O-2A, los cuales dan lugar también a oligodendrocitos (revisado en Liu y Rao, 2004), esto llevó además a relacionar directamente el linaje de los astrocitos con el de los oligodendrocitos. Estos progenitores O-2A, que después pasaron a llamarse OPC, han sido finalmente relacionados con las células NG2 (Richardson y cols., 2011), creando una nube confusa de relaciones de linaje entre astrocitos, oligodendrocitos y ploidendrocitos. A tal nube de relaciones parecen contribuir nuestros datos que demuestran que aunque escasas, probablemente existen algunas poblaciones de oligodendrocitos y células NG2 en las que o bien el promotor del GFAP humano está activo o bien derivan de células que lo tuvieran activo. Estos resultados encajarían perfectamente con otros trabajos que han utilizado este fragmento como promotor y que también han detectado la presencia de células NG2 (Matthias y cols., 2003). Esto hace que se requiera un análisis más profundo en cada modelo de gliogénesis que determine cuales son los

nodos comunes, así como una definición de los tipos celulares basada en propiedades realmente intrínsecas y no solamente en marcadores moleculares.

Precisamente, basándonos en el linaje como propiedad intrínseca que además determina otras propiedades intrínsecas, nuestros resultados reafirman que los astrocitos fibrosos deben ser clasificados en un subgrupo independiente, tal como se hizo en la clasificación clásica. Así pues, nuestros resultados han determinado la existencia de progenitores que producen únicamente astrocitos fibrosos, sugerido y parcialmente observado en otros trabajos (Miller y Raff, 1984; Grove y cols., 1993). La presencia de clones formados exclusivamente por astrocitos fibrosos implica la existencia de progenitores que se han especializado en la producción de astrocitos fibrosos. Esto es una característica intrínseca a estas células progenitoras y no parece deberse a que el ambiente en el cuerpo calloso sea el que determine que tales progenitores generen el clon de astrocitos fibrosos ya que los límites de la sustancia blanca y gris son finísimos, y en ese microambiente debieran aparecer clones mixtos entre astrocitos fibrosos y protoplásmicos. Lejos de ocurrir esto, observamos que hay células flanqueando el cuerpo calloso que por un lado están en contacto con la sustancia gris. Si el progenitor no tuviera únicamente el potencial de producir astrocitos fibrosos sería difícil explicar la ausencia de clones mixtos y la restricción de los clones fibrosos a la región del cuerpo calloso. No obstante, aunque es evidente la presencia de estos progenitores especializados, no podemos descartar que aunque minoritarios, también existan otros progenitores bipotenciales que puedan producir astrocitos fibrosos y protoplásmicos. Asimismo, la gran variedad de morfologías a nivel del cuerpo calloso, algunas de ellas aparentemente propias de células poco desarrolladas, apunta a la presencia de progenitores gliales incluso en edad adulta.

Si bien los astrocitos protoplásmicos y fibrosos constituyen dos ramas del linaje astrocitario, no son las únicas. La gran concentración de astrocitos subpiales nos llevó en este trabajo a analizar la composición de las poblaciones clonales de este tipo. Lo primero que vimos fue que estas células se caracterizan por una morfología muy distintas a la de los astrocitos protoplásmicos. Mientras que los astrocitos protoplásmicos tienen múltiples procesos finamente ramificados, los astrocitos subpiales suelen adquirir morfologías laminares que en ocasiones no recuerda nada a un astrocito. A pesar de que esta podría ser una adaptación morfológica a esa región, la mayoritaria presencia de clones astrocitarios exclusivamente compuestos por astrocitos piales, hace evidente la existencia de progenitores especializados en la producción de este tipo de astrocitos. De otra forma sería muy difícil explicar que apenas existan clones mixtos formados por astrocitos piales y protoplásmicos. La única explicación que podría existir para esto sería que el progenitor migre hasta esa región y se asocie irreversiblemente de algún modo con los fibroblastos de la piamadre, de manera que toda su progenie se produzca en esa región. Sin embargo, ni siquiera esto parece probable porque en ese caso también se esperaría que bastantes progenitores que empezasen a dividirse antes de alcanzar la pia, produjeran una parte de astrocitos protoplásmicos y otra parte piales, con lo cual la proporción de clones mixtos también tendría que ser superior. Además, el simple hecho de que un progenitor migre tanto como para alcanzar la pia y otros se queden

mucho más abajo, también podría ser reflejo de las propiedades intrínsecas del progenitor, y por ende de su potencialidad.

Uno de los hechos que podrían sugerir que no se trata de progenitores especializados sería la existencia, aunque escasa, de clones mixtos protoplásmicos y piales. Debido a que la caracterización que se ha hecho en este trabajo es básicamente morfológica, es posible que algunos de los astrocitos hayan sido incorrectamente clasificados como piales o protoplásmicos debido a que tenían una morfología intermedia. Por tanto, futuros estudios debieran plantearse la necesidad de buscar marcadores específicos. Otra posibilidad es que haya varios subtipos de astrocitos piales o que algunos de los protoplásmicos formen también parte de la pía. Asimismo, es posible también que no todos los progenitores estén tan especializados, existiendo algunos que puedan producir astrocitos piales y protoplásmicos (o incluso también fibrosos). De hecho, la presencia de progenitores (por ejemplo la glía radial) que produzcan células tan distintas como una neurona y un astrocito no implica que no existan otros progenitores especializados en uno u otro fenotipo.

Hasta la fecha, ningún estudio de linajes astrocitarios ha descrito la presencia de estos clones de astrocitos piales. No obstante, un modelo de inyección de retrovirus en SVZ postnatal muestra algunos clones mucho más pequeños exclusivamente formados por astrocitos piales (Zerlin y cols., 2003, tabla 1). Esto refuerza nuestros resultados y confirma la existencia de progenitores que dan lugar únicamente a astrocitos piales. A pesar de que algunos de estos progenitores ya se encuentran en la superficie pial dividiéndose tan temprano como E18, queda mucho por saber sobre su generación temporal y si los progenitores o ellos mismos expresan algún marcador molecular. En cualquier caso, la distinta morfología, localización, origen en el linaje y posiblemente función como glía limitans, hace necesaria la separación de los astrocitos piales en una nueva categoría de astrocitos distinta de la de los astrocitos fibrosos y protoplásmicos (Holen, 2011).

De este modo, tenemos datos concluyentes que, basándose en propiedades extrínsecas como la localización o la morfología pero sobre todo en propiedades intrínsecas como el linaje, soporten tres subtipos de astrocitos: los fibrosos, los protoplásmicos y los piales. Debido a que estos subtipos derivan de distintos progenitores especializados en cada caso, podemos estar seguros de que no se trata de distintas manifestaciones del mismo tipo de astrocito. No obstante, queda mucho por hacer en la búsqueda de marcadores que nos permitan distinguir cada progenitor antes de que genere su progenie. Esto permitiría manipularlos o eliminarlos para estudiar las consecuencias y por tanto la función que tiene cada subtipo en el cerebro.

E. PAPEL DEL DESARROLLO EN LA DETERMINACIÓN DE HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA *IN VIVO*

Nuestro trabajo ha demostrado que el desarrollo tiene un papel fundamental en la determinación de la heterogeneidad astrocitaria. El linaje de cada célula determinará a grandes

rasgos su fenotipo, lo cual incluye su morfología, localización y muy posiblemente expresión génica. Mientras que para las neuronas el papel que tiene el desarrollo en la determinación de los distintos fenotipos ha sido ampliamente estudiado y establecido, apenas existen trabajos que relacionen directamente el desarrollo con la heterogeneidad en las poblaciones gliales. Los astrocitos se originan a partir de distintos tipos de progenitores (Cameron y Rakic, 1991; Marshall y cols., 2003; revisado en Hewett, 2009), lo que sugeriría que las diferencias entre los distintos tipos de progenitores debieran desembocar en diferencias entre las distintas progenies a las que dan lugar. Por ejemplo, sería lógico pensar que aquellos astrocitos que se originan a partir de la transformación de la glía radial fuesen diferentes a los que se producen a través de progenitores intermedios (Marshall y cols., 2003). Uno de los pocos trabajos que analiza el papel del desarrollo en la producción de heterogeneidad astrocitaria, determinó que distintos dominios génicos de la médula espinal de pollo producen distintos fenotipos astrogliales en base a su expresión de algunos marcadores (Hochstim y cols., 2008). No obstante, debido a que éste estudio analizó únicamente edades muy tempranas, poco se sabe sobre el mantenimiento de tal heterogeneidad en el adulto, así como si dicha heterogeneidad se traduce también en una heterogeneidad funcional. Por tanto, nuestro trabajo supone un importante paso hacia delante en el intento de comprender cómo el desarrollo actúa creando las intrínsecamente diversas poblaciones astrocitarias, que sin duda alguna impactarán de forma distinta en la funcionalidad cerebral.

III. MODELO DE MIGRACIÓN BASADO EN LAS IMPLICACIONES DE LA HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA INTRÍNSECA

La migración de los progenitores de interneuronas de BO constituye uno de los modelos más estudiados de desarrollo en general y de migración en particular. Sin embargo, lo que se conoce es principalmente a nivel molecular y poco se sabe a nivel celular. De validarse nuestro modelo *in vitro* esto supondría que la heterogeneidad astrocitaria tendría un papel fundamental en la migración de precursores de interneuronas de BO. Y dentro de esta heterogeneidad, creemos que es precisamente la heterogeneidad intrínseca a los astrocitos la que en última instancia determina cómo se produce esta migración.

Como se puede ver en la **figura 72**, el camino que siguen los neuroblastos en su migración no es aleatorio. Viene determinado por la generación de un microambiente especial que permite que su migración ocurra por ahí y no por otras regiones. En un intento de transplante de un BO a partir de un animal que expresaba GFP ubicuamente bajo el promotor de la β -actina, sobre otro al que se le realizó la ablación de uno de sus BO, llegamos a constatar que la RMS es un sustrato tremendamente permisivo para la migración. Esto se reflejaba en la migración de células desde el BO trasplantado hacia el resto del parénquima cerebral, pero fundamentalmente dentro de los límites de la RMS. Este patrón indica la posible existencia de factores determinando esa permisividad.

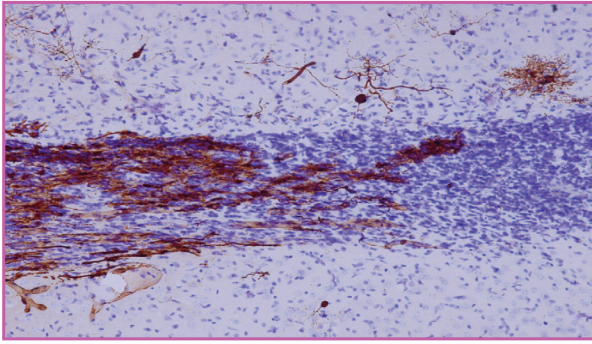


Figura 72. Migración por la RMS en sentido contrario tras un trasplante de bulbo olfativo. Las células, expresando GFP revelado por inmunohistoquímica, avanzan desde un BO transplantado respetando los límites de la RMS.

La tremenda presencia astrogliar rodeando la ruta migratoria y también a nivel del BO sugirió que los astrocitos podrían estar determinando tal ambiente permisivo. Esto fue confirmado por nuestros análisis que mostraron resultados contundentes a este respecto. ¿Pero es extrapolable el modelo *in vitro* a la migración real que ocurre en el cerebro? A pesar de las diferencias entre las monocapas *in vitro* y los astrocitos *in situ*, muchas razones nos hacen pensar en la extrapolación de tal modelo. Por una parte, el hecho de que no solamente la astrogliá cortical actúa soportando pobremente la migración sino también otros orígenes astrogliales no permisivos *in vivo* hace mucho menos probable una correlación casual.

Además, parece que los astrocitos *in vitro* retienen algunas de sus propiedades morfológicas ya que tanto los de RMS como los de BO presentan morfologías fusiformes, mientras que en ambas regiones aparecen *in vivo* formas con largos procesos que no se encuentran en otras zonas como Cx. Esto podría estar asociado a un mayor estado de inmadurez, ya que por ejemplo los astrocitos de RMS tienen mayor capacidad de proliferación. Esta característica es también un reflejo *in vitro* de lo que sucede en la RMS en el cerebro (Emsley y Macklis, 2006). Asimismo, aunque es cierto que la expresión génica cambia considerablemente, como muestran los estudios de Cahoy y cols. (2008), no parece perderse el fenotipo astrogliar lo cual apunta a que globalmente un astrocito sigue siendo lo que era *in situ*. Esto lo hemos confirmado en nuestros análisis de expresión génica para algunos de los genes analizados aunque no para otros. En su conjunto, esto hace pensar que existen bastantes razones para pensar en la validez del modelo.

Si asumimos dicha validez, parece razonable pensar que la permisividad se trata de una propiedad con un gran componente intrínseco ya que a grandes rasgos se retiene incluso cuando el microambiente cambia completamente como ocurre *in vitro*. Sobre esto podría plantearse la objeción de que si el cultivo de astrocitos de una región genera un microambiente distinto al de otra región, los astrocitos individualmente se podrían ver expuestos a microambientes distintos. No obstante y aunque así fuera, no dejaría de ser una propiedad intrínseca a nivel poblacional.

El papel de las poblaciones astrocitarias en la determinación de la permisividad del tejido ha sido ampliamente documentado sobre todo en estudios de axogénesis. De hecho se ha visto que las diferencias en la permisividad entre poblaciones astrogliales mediales y laterales parecen estar implicadas en la construcción de una barrera al crecimiento axonal a nivel de la línea media mesencefálica (García-Abreu y cols., 1995, 2000). Otro ejemplo es su papel en los barriles de

la corteza somatosensorial, ya que impiden el crecimiento de neuritas fuera de las paredes de los barriles (Steindler y cols., 1995). En transplantes de mesencéfalo ventral sobre estriado, el cotransplante con astrocitos de corteza o estriado atrajo muchos más axones serotoninérgicos que cuando se utilizaron astrocitos de mesencéfalo ventral o cuando se prescindió de ellos. Como es bien sabido además, los astrocitos crean un ambiente totalmente no permisivo al crecimiento axonal en el caso de lesiones (revisado en Stiche y Müller, 1998). Debido a que la migración neuronal y el crecimiento axonal se producen a través de muchos mecanismos moleculares comunes, en una aproximación preliminar hemos llevado a cabo algunos transplantes de astrocitos de RMS y BO (de animales expresando ubicuamente el GFP) en lesiones axonales del cuerpo calloso que se ilustran en la **Figura 73**. Aunque queda mucho por hacer a este nivel, hemos demostrado que existe crecimiento axonal sobre estos astrocitos, que en algunos casos podría estar dirigido.

Además, los astrocitos parecen cumplir un importante papel en la determinación de la permisividad a la migración. A menudo, los neuroblastos en migración alcanzan el límite de la

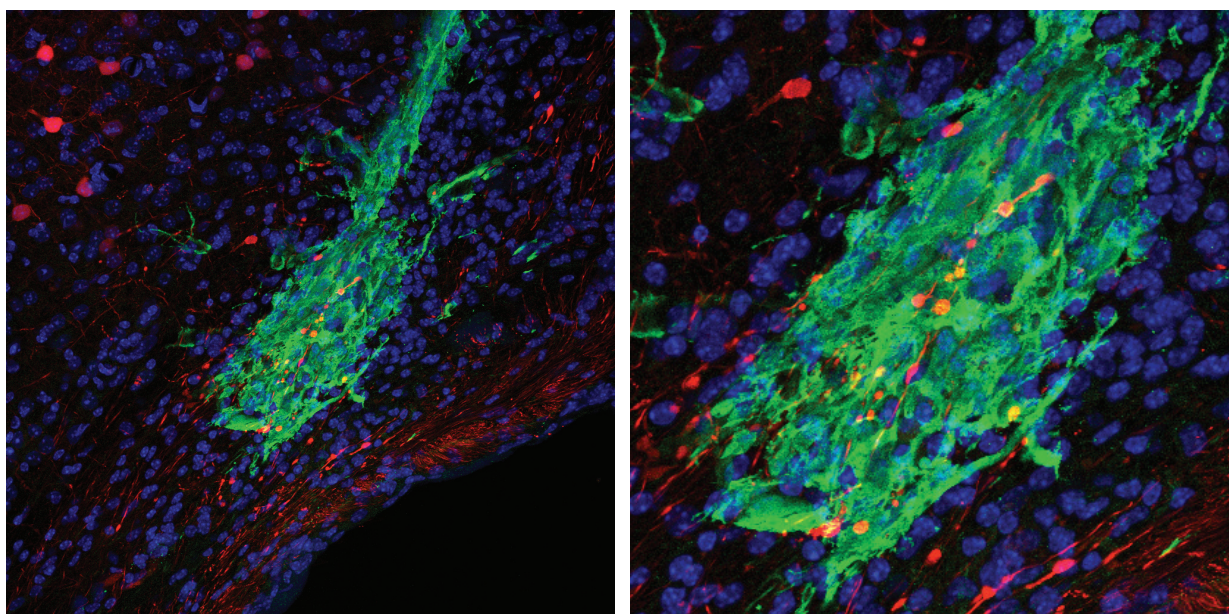


Figura 73. Transplante de una mezcla de astrocitos de BO y RMS sobre una lesión del cuerpo calloso. En rojo se puede observar el crecimiento de axones, previamente marcado por inyección de BDA en corteza, sobre estos astrocitos que expresan GFP por venir de un animal con expresión ubicua de GFP bajo promotor de la β -actina.

SVZ/sustancia blanca, se paran y cambian su dirección, lo cual sugiere claramente una frontera entre las zonas permisivas y no permisivas a la migración (Suzuki and Goldman, 2003). Dada la gran densidad de astrocitos que existe en la RMS, varios autores han postulado que los tubos gliales que envuelven a las cadenas migratorias suponen un impedimento físico que evita la salida de células hacia otras regiones, definiendo así los límites del camino migratorio (Jankovski y Sotelo, 1996; Alves y cols., 2002; Peretto y cols., 1997). Si bien este mecanismo de túnel parece bastante

obvio, nuestros resultados *in vitro* parecen indicar que existe otro mecanismo a través del cual los astrocitos determinan la migración de estos progenitores de interneuronas de BO. La producción de factores de contacto, principalmente matriz extracelular, parece estar determinando el espacio por el que los neuroblastos pueden migrar. De este modo, los astrocitos actuarían como productores de un asfalto que marcaría la dirección y el destino de los neuroblastos, en lo que hemos venido a llamar “astropistas” de migración neuronal. De hecho, Bovetti y cols., (2007) observaron una capa de matriz extracelular interpuesta entre astrocitos y neuroblastos que podría servir como sustrato a la migración, como ocurre en los cultivos con sustrato de laminina. Adicionalmente pueden existir otros factores como un papel activo de los astrocitos corticales y en general adyacentes en la represión de la migración hacia regiones erróneas, o incluso la presencia de otros tipos celulares e impedimentos físicos que ayudasen a los astrocitos a llevar a cabo su función en la restricción de la migración. Sin embargo, esta relación astrocito-neuroblasto puede tener dos filos ya que una presencia excesiva de procesos astrocitarios en el núcleo de la RMS podría actuar a la vez como impedimento físico si bien. Para evitar este problema parece existir un mecanismo mediado por Slit y Robo que permite que los neuroblastos limiten y repelan a los procesos astrocitarios, lo que les convierte en pequeñas “tuneladoras” que crean el espacio por el que migran (Kaneko y cols., 2010).

El hecho de que los astrocitos sean suficientes y necesarios para definir la migración de estos neuroblastos, simplemente traslada la pregunta sobre los mecanismos que controlan esta migración, pero no la responde. ¿Qué mecanismos controlan la localización precisa de las distintas poblaciones astrogliales implicadas? Como se ha razonado anteriormente, parece lógico que la permisividad determinada por los astrocitos es una propiedad con un importante componente intrínseco, lo que hace pensar que es el desarrollo y no el microambiente el que juega un papel fundamental en la localización precisa de las distintas poblaciones astrogliales con propiedades de permisividad específicas. De hecho, nuestro análisis clonal con Star Track reveló la presencia de poblaciones astrogliales muy distintas entre BO, RMS y Cx. Mientras que en Cx las poblaciones astrogliales fueron fundamentalmente astrocitos maduros con morfologías protoplásmicas, la RMS, mostraba células con una clara apariencia de progenitores. De hecho, la presencia en la RMS de células con procesos radiales que no aparecen en grupos, hace pensar que se trata de un tipo de glía radial que permanece incluso en edad adulta. Asimismo, otros tipos celulares que aparecen en pequeños clones también tienen la apariencia de células inmaduras y por su íntima agrupación parece tratarse de precursores en división. Algo similar pero a menor escala sucede con el BO, donde fue evidente la presencia de células poco diferenciadas, algunas de las cuales mostraron procesos radiales que también recordaban a la glía radial embrionaria. Además, resultados preliminares de nuestro laboratorio también sugieren que los astrocitos de RMS y BO podrían mantener en cierto estado de indiferenciación a las interneuronas, lo cual apunta a que estas regiones retienen algo de su fenotipo embrionario. De hecho, este fenotipo podría estar más especializado en soportar la migración debido a la gran cantidad de fenómenos de este tipo que

ocurren en embrionario. En última instancia esto parece manifestarse en poblaciones astrogliales que persisten como inmaduras y que por su capacidad en la producción de matriz extracelular determinarían la permisividad del ambiente. A esto habría que sumarle el rol que puedan jugar las propiedades dependientes del ambiente. De hecho, la masiva migración que ocurre en estas regiones hace que el microambiente sea completamente distinto al de otras regiones, reflejo de lo cual podría ser la tremenda expresión de GFAP que parece más propia de una lesión (**ver Figura 42**). Por tanto nuestros resultados *in vitro* apuntan a un papel fundamental de la astroglia en el soporte y restricción de esta migración.

Algunos trabajos previos han sugerido que los astrocitos no son esenciales para esta migración basándose en tres hechos controvertidos: 1) no existen astrocitos maduros durante el pico de neurogénesis; 2) los neuroblastos experimentan migración en cadena sobre matrigel incluso en la ausencia astrogliar; y 3) existen contactos especializados entre neuroblastos pero nunca entre neuroblastos y astrocitos, siendo este tipo de contactos esenciales, por ejemplo, en la migración de neuroblastos a través de glía radial. En primer lugar, nuestros resultados y los de otros autores demuestran que existe expresión de GFAP en la SVZ/RMS durante la primera semana postnatal. De hecho, ya en esta edad es evidente la presencia de progenitores astrogliales y glía radial que en algunos casos se está transformando en astrocitos. Esto hace razonable plantear que estas células pudieran tener ya algunas de las funciones implicadas en el soporte de la migración y por tanto ser las representantes de los astrocitos en edades algo más tempranas. En cuanto a los experimentos con matrigel, cabe advertir que el matrigel es una mezcla de matriz extracelular producida por el tumor EHS (Kleinman y Martin, 2005) y podría estar supliendo algunas de las proteínas y efectores que en condiciones normales proporcionan los astrocitos. Por último, aunque es cierto que no existen contactos especializados entre neuroblastos y astrocitos, todo apunta a que los astrocitos, a diferencia de la glía radial que actúa como raíles para la migración, podrían promover la migración a través de la producción de matriz extracelular.

En contraposición a estos hechos y apoyando nuestros resultados, se ha evidenciado una profunda influencia astrogliar en la migración tangencial de estos neuroblastos. Esto se refleja, por ejemplo, en que la migración es un 20% más rápida dentro de tubos gliales que cuando las células migran individualmente (Bovetti y cols., 2007). Lo contrario sucede con las cadenas migratorias que se dan en el parénquima cerebral del conejo, que no están envueltas por glía y en las que las células migran más lentamente (Luzzati y cols., 2003; Ponti y cols., 2006). Además, se ha descrito la presencia de una sustancia soluble derivada de astroglia que potencia la migración de estos neuroblastos (Mason y cols., 2001) aunque en nuestro estudio no lo hemos detectado. Del mismo modo, el papel astrogliar en la migración se refleja en el hecho de que la inhibición de la recaptura de GABA en astrocitos reduce la tasa de migración (Bolteus y Bordey, 2004). Finalmente, otros mecanismos más indirectos podrían tener un papel importante, como la atracción que producen sobre el crecimiento de vasos sanguíneos que también parecen participar en la direccionalidad de la migración. Por tanto, en conjunto todo apunta a que los astrocitos son fundamentales en el

soporte de la migración de estos neuroblastos.

Resumiendo, la cautelosa extrapolación de nuestros resultados a lo que ocurre *in situ* permite completar el modelo de migración de progenitores de interneuronas de BO. La proliferación de progenitores tipo B en la SVZ y en algunas regiones de la RMS produciría células de amplificación rápida (tipo C) que se dividirían para generar rápidamente neuroblastos migradores. Estos neuroblastos se desplazarían tangencialmente desde la SVZ, en forma de cadenas migratorias, a través de la RMS sin salirse de sus límites. Esta restricción se produciría, al menos en parte como resultado de la existencia de poblaciones astrogliales heterogéneas. La combinación de astroglia no permisiva fuera de los límites de la RMS con la astroglia de la RMS y BO permitiría que los neuroblastos siguiesen su camino al BO evitando regiones erróneas. Una que llegan al BO, las cadenas migratorias se deshacen y los neuroblastos cambian a una migración radial y no en cadena. Esto implica la necesidad de buscarse otros soportes migratorios. Aparte del sinnúmero de moléculas implicadas en este cambio, la tremenda permisividad de la astroglia bulbar podría inducir, por sí sola, el cambio de migración tangencial por la RMS a migración radial hacia las distintas capas del BO, tendiendo la mano a los neuroblastos recién llegados. Esto podría reflejarse en el hecho de que los vasos sanguíneos, y por tanto la cubierta astrogliar que los rodea, son fundamentales en el andamiaje de la migración radial (Bovetti y cols., 2007b). En su conjunto, todo esto estaría orquestado por el desarrollo, que produciría la emergencia de factores extrínsecos de inmadurez del tejido a partir de propiedades intrínsecas de las células individuales. A pesar de que gran parte de este modelo se basa en hipótesis razonables, mucho queda por demostrar como por ejemplo qué ocurre cuando tras una lesión aparentemente se pierde la restricción del camino, lo que hace que las células lo abandonen en ruta hacia el lugar de la lesión (Faiz y cols., 2008).

IV. HETEROGENEIDAD ASTROCITARIA Y EVOLUCIÓN

En la evolución, se estima que la glía apareció mucho después que las primeras neuronas. Sin embargo, la relevancia de sus primeras funciones primitivas provocó que además de mantenerse en la mayoría de grandes ramas filogénicas en las que apareció, sufrió un largo proceso de especialización y diversificación que en última instancia genera la complejidad de las poblaciones que conocemos hoy en día. ¿Pero cómo se produce ésta diversificación y especialización?. Debido a la ausencia del registro fósil de tejidos blandos, a la imprecisión de los árboles filogenéticos y a muchos otros factores, es difícil responder retrospectivamente a esta pregunta y cualquier razonamiento está cargado de especulación. Pero lo que resulta claro es que es más posible que las diferencias entre tipos gliales se generaran a partir de pequeñas diferencias previas a que lo hicieran por cambios drásticos como que de una célula epitelial se produjera un oligodendrocito mielinizante. Esto plantea que la heterogeneidad entre células del mismo fenotipo no sea más que el reflejo de esos estados intermedios, que además de ser útiles en sí mismos, constituyen la puerta a fenotipos gliales completamente distintos y especializados.

Si tomásemos una instantánea evolutiva del cerebro de ratón, la heterogeneidad astrocitaria podría aparecer como un paso previo en la generación de futuros tipos gliales, probablemente más complejos y especializados. Y particularizando un poco más, no es descabellado pensar que quizá los clones de astrocitos piales tiendan a especializarse y diferenciarse más, de modo que finalmente sea imposible clasificarlos dentro del linaje astrocitario. De hecho, estaríamos a unas pocas mutaciones acertadas para que, por ejemplo, estas células dejaran de expresar ciertos marcadores o expresasen algunos nuevos. Algo similar podría haber ocurrido con la expresión de GFAP en la endimoglia (Bodega y cols., 1994), la cual ha ido desapareciendo lentamente en la filogenia, situando a éstas como subtipo distinto de glía. En el hipotético caso de que eso se produjera, cabe pensar que atendiendo solo a su morfología no pudiésemos relacionar a los astrocitos piales para nada con el fenotipo astrogial. Únicamente por su linaje como ocurre ahora con las células endimarias..

Olvidándonos de las clásicas teorías recapitulistas, pero teniendo en cuenta que evolución y desarrollo se encuentran íntimamente unidos, esto nos lleva a plantearnos que, de confirmarse las conexiones en el linaje entre oligodendrocitos, células NG2 y astrocitos, podría ser el reflejo de algún tipo de relación filogenética entre estos subtipos. Lo mismo ocurriría al relacionar cualquiera de esos subtipos con la glía radial, la cual por sus características, su relación de linaje con los distintos tipos neurales y su origen en las células neuroepiteliales podría tratarse de una de las células astrogiales más antiguas en la filogenia. Esto se evidenciaría por el hecho de que aparte de existir en pájaros y mamíferos, constituye el tipo glial dominante en reptiles (Kálmán and Pritz, 2001).

Por otra parte y en el contexto de este trabajo, cabe remarcar a la placoda olfativa como modelo muy interesante para el estudio de la aparición glial en la filogenia ya que contribuye con células muy similares a los astrocitos a pesar de ser un origen completamente distinto. Además, debido a que en la placoda olfativa se produce un recambio continuo de las poblaciones neuronales a partir de células del epitelio olfativo, esto podría indicar que las células epiteliales llevan produciendo neuronas durante mucho tiempo. De hecho, las células neuroepiteliales no serían más que una especialización. Y la glía radial sería una célula neuroepitelial que surge como respuesta a un mayor tamaño cortical. Pero, ¿dónde se deben situar los astrocitos en relación a su origen filogénico?. Debido a que los astrocitos proceden de la transformación de la glía radial en la ontogenia, lo más probable es que también procedan de modificaciones de glía radial en la filogenia. Sin embargo, la existencia de otro origen a partir de progenitores intermedios hace replantearse esto a la espera de conocer más sobre la asociación entre su fenotipo y su procedencia en el linaje. Sin duda alguna Star Track será fundamental para responder a estas preguntas.

CONCLUSIONES

En base a los objetivos propuestos, el trabajo expuesto en esta Tesis Doctoral ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. La migración de progenitores al BO está íntimamente asociada con la presencia de poblaciones astrogliales, que durante el pico de neurogénesis están compuestas principalmente por glía radial y progenitores astrocitarios.
2. Los cultivos de astroglia de BO y RMS están compuestos por una gran proporción de células principalmente de morfología fusiforme, al contrario de lo que ocurre en monocapas de astroglia cortical, caracterizadas por células de morfología poligonal y medianamente estrelladas.
3. Los cultivos de astroglia en monocapa soportan la migración de neuroblastos y constituyen un buen modelo para el análisis de dicha migración.
4. En comparación con las monocapas de regiones no permisivas, las monocapas astrogliales que proceden de regiones permisivas a la migración, como RMS y BO, soportan muy eficazmente la migración de neuroblastos desde un explante de RMS *in vitro*. Además, dentro de las regiones permisivas, son las monocapas de BO las que permiten la mayor migración de neuroblastos. Estas diferencias no están mediadas ni por diferencias en el número de células astrogliales, ni por una proliferación de neuroblastos diferencial ni por diferencias en la densidad celular entre las distintas monocapas.
5. A nivel celular, las diferencias en migración en los cultivos astrogliales están mediadas por múltiples factores de poco efecto en la dinámica migratoria. De este modo, un aumento progresivo de los periodos estacionarios de las células en el caso cortical, algo menor en RMS y nulo en BO parece estar produciendo diferencias a nivel de desplazamiento neto y velocidad media que a su vez determinan las diferencias en migración mostradas por el estudio estático.
6. A nivel molecular, los factores astrogliales que determinan las diferencias en migración se manifiestan como factores de contacto asociados a las células. Entre los distintos genes analizados, la *Thbs1* y *Ecm1* constituyen excelentes candidatos moleculares para determinar las diferencias migratorias tanto *in vitro* como *in vivo*.
7. Star Track constituye un potente, preciso y eficaz método de análisis clonal en poblaciones astrocitarias *in vivo*.
8. En corteza cerebral, la dispersión clonal de astrocitos se produce por la división simétrica de progenitores desde E18., provocando la presencia de grupos de hasta 50 células hermanas que ocupan varias capas corticales. Algunos de estos grupos se distribuyen ocupando únicamente un vaso sanguíneo.
9. Los astrocitos fibrosos que se encuentran en el cuerpo calloso se producen a partir de progenitores especializados y constituyen por tanto una rama de linaje distinta a la del resto de astrocitos.
10. Los astrocitos piales o subpiales constituyen una rama separada del linaje astrocitario

no descrita previamente, que ya en E18 empiezan a distribuirse como clones exclusivamente localizados en dicha región. Su morfología completamente atípica para el fenotipo astrocitario se caracteriza por somas laminares de los que apenas salen procesos y que contribuyen a la *glia limitans*.

11. En la RMS la distribución astrogial se produce como una mezcla de células individuales que parecen corresponder a glía radial reminiscente, pequeños clones compuestos por células aparentemente inmaduras y algunos astrocitos protoplásmicos rodeando a la migración.

12. En el BO, la astrogliogénesis se produce de forma bastante organizada, dando lugar a clones astrocitarios que suelen restringirse a una o dos capas del bulbo y algunas células aparentemente inmaduras con procesos radiales. A nivel de la capa glomerular, los astrocitos suelen participar con sus procesos en uno o dos glomérulos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott N.J., Ronnback L., Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41–53.
2. Aberg, F., Kozlova E. N. 2000. Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein in the developing and adult central nervous system. *J Comp Neurol* 424: 269–282.
3. Adrian, E. K. Jr. 1968. Cell division in injured spinal cord. *Am J Anat* 123: 501–520.
4. Alves, J.A., Barone, P., Engelender, S., Froes, M.M., Menezes, J.R. 2002. Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. *J Neurobiol* 52: 251–265.
5. Anderson C.M, Swanson R.A. 2000. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1–14.
6. Andriezen, W.L. 1893. The neuroglia elements of the brain. *Br Med J*, 2:227–230.
7. Aschner M. 1997. Astrocyte metallothioneins (MTs) and their neuroprotective role. *Ann N Y Acad Sci* 825: 334–347.
8. Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., DePinho, R.A. 2004. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8384–8389.
9. Bailey, M.S., Shipley, M.T. 1993. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol* 328: 501–526.
10. Ballanyi K., Grafe P., ten Bruggencate G. 1987. Ion activities and potassium uptake mechanisms of glial cells in guinea-pig olfactory cortex slices. *J Physiol (Lond)* 382: 159–174.
11. Bartlett, P.F., Noble, M., Pruss, R.M., Raff, M.C., William, C.A. 1981. Rat neural antigen-2 (Ran-2) a cell surface antigen on astrocytes, ependymal cells, Muller cells and leptomeninges defined by a monoclonal antibody. *Brain Res* 204:339–351.
12. Bechterew, W. 1899. Ueber die Entwicklung der Zellelemente in der Grosshirnrinde des Menschen. *Neurol Centralbl* 18:770–772.
13. Becker, H.J. 1957. Roentgen mosaic spots & defective mutations at the eye of *Drosophila* & the evolutive physiology of the eye. *Z Indukt Abstamm Vererbungsl* 88: 333–373.
14. Bedini C., Lanfranchi A. 1991. The central and peripheral nervous system of Acoela (Platyhelminthes). An electron microscopical study. *Act Zool (Stockh)* 72: 101–106.
15. Behar, T., McMorris, F.A., Novotny, E.A., Barker, J.L., Dubois-Dalcq, M. 1988. Growth and differentiation properties of O-2A progenitors purified from rat cerebral hemispheres. *J Neurosci Res* 21: 168–180.
16. Belvindrah, R., Hankel, S., Walker, J., Patton, B.L., Muller, U. 2007. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *J Neurosci* 27: 2704–2717.
17. Bentivoglio M., Mazzarello, P. 1999. The history of radial glia. *Brain res bull* 49: 305–315.
18. Bergles, D.E., Roberts, J.D., Somogyi, P., Jahr, C.E. 2000. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405: 187–191.
19. Bergmann, E. 1857. Notiz über einige strukturverhältnisse des cerebellum und rückenmarks. *Zeitschrift für rationelle Medizin, Neue Folge* 8: 360–364.
20. Bery A., Cardona A., Martinez P., Hartenstein V. 2010. Structure of the central nervous system of a juvenile acoel Symagittifera roscoffensis. *Dev Genes Evol Online* DOI 10.1007/s00427-010-0328-2.
21. Bignami, A., Eng, L., Dahl, D., Uyeda, C. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in the astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43: 429–435.
22. Biserova N.M., Gordeev I.I., Korneva J.V., Salnikova M.M. 2010. Structure of the glial

- cells in the nervous system of parasitic and free-living flatworms. *Biol Bull* 37:277–287.
23. Blanchart, A., Martín-López, E., De Carlos, J., López-Mascaraque, L. 2011. Peripheral contributions to olfactory bulb cell populations (migrations towards the olfactory bulb). *Glia* 59: 278–292.
 24. Bodega, G., Suárez, I., Rubio, M., Fernández, B. 1994. Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry* 102: 113-122.
 25. Bolteus, A.J., Bordey, A. 2004. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24: 7623-7631.
 26. Bonnerot, C., Nicolas, J.F. 1993. Clonal analysis in the intact mouse embryo by intragenic homologous recombination. *C R Acad Sci III* 316: 1207–1217.
 27. Bovetti, S., Bovolín, P., Perroteau, I., Puche, A.C. 2007a. Subventricular zone-derived neuroblast migration to the olfactory bulb is modulated by matrix remodelling. *Eur J Neurosci* 25: 2021-2033.
 28. Bovetti, S., Hsieh, Y.C., Bovolín, P., Perroteau, I., Kazunori, T., Puche, A.C. 2007b. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27: 5976-5980.
 29. Bozoyan, L., Khlghatyan, J., Saghatelian, A. 2012. Astrocytes Control the Development of the Migration-Promoting Vasculature Scaffold in the Postnatal Brain via VEGF Signaling. *J Neurosci* 32: 1687-1704.
 30. Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 397-424.
 31. Brodal, A. 1939. Experimentelle Untersuchungen über retrograde Zellveränderungen in der unteren Olive nach Läsionen des Kleinhirns. *Z Ges Neurol Psychiat* 166: 646-704.
 32. Bullock T.H., Horridge G.A. 1965. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. San Francisco, London: W.H. Freeman. 1719 p.
 33. Bunge, R.P., Bunge, M.B., Ris, H. 1960. Electron microscopic study of demyelination in an experimentally induced lesion in adult cat spinal cord. *J Biophys Biochem Cytol* 7:685-696.
 34. Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22: 183-192.
 35. Butt, A.M. 2005. Structure and function of oligodendrocytes. En *Neuroglia*. Eds. Kettenmann H. y Ransom B.R. Oxford University Press, Inc. New York. 36-47.
 36. Butt, A.M., Duncan, A., Hornby, M.F., Kirvell, S.L., Hunter, A., Levine, J.M., Berry, M. 1999. Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia* 26: 84–91.
 37. Cai, J., Chen, Y., Cai, W.H., Hurlock, E.C., Wu, H., Kernie, S.G., Parada L. F., Lu Q. R. 2007. A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development* 134: 1887–1899.
 38. Cajal, S.R. 1896. Sobre las relaciones de las células nerviosas con las neuróglías. *Rev Trimestral Micrográfica* 1: 38-41.
 39. Cajal, S.R. 1909-1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Trad. L. Azoulay). Paris: Maloine.
 40. Cajal, S.R. 1913. Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. *Trab Lab Invest Biol* 11:255-315.
 41. Cajal, S.R. 1920. Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Robertson y Río Hortega.

- Trab Lab Invest Biol Univ Madrid, 18:109-127.
42. Cajal, S.R. 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system. London: Oxford UP.
43. Cameron, R.S., Rakic, P. 1991. Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4: 124–137.
44. Cameron, R.S., Rakic, P. 1994. Polypeptides that comprise the plasmalemmal microdomain between migrating neuronal and glial cells. *J Neurosci* 14: 3139–3155.
45. Cammermeyer, J. 1955. Astroglial changes during retrograde atrophy of nucleus facialis in mice. *J Comp Neurol* 102: 133–150.
46. Cammermeyer, J. 1960. The distribution of oligodendrocytes in cerebral gray and white matter of several mammals. *Am J Anat* 107: 107-127.
47. Campbell, K., Götz, M. 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25: 235–238.
48. Caron, S.J., Prober, D., Choy, M., Schier, A.F. 2008. In vivo birthdating by BAPTISM reveals that trigeminal sensory neuron diversity depends on early neurogenesis. *Development* 135: 3259–3269.
49. Cavanagh, J.B. 1970. The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain. *J Anat*, 107: 471–487
50. Chehrehasa, F., Windus, L.C., Ekberg, J.A., Scott, S.E., Amaya, D., Mackay-Sim, A., St John, J.A. 2010. Olfactory glia enhance neonatal axon regeneration. *Mol Cell Neurosci* 45: 277-288.
51. Chen, Y., Swanson, R.A. 2003. The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 84:1332–1339.
52. Chiu A.Y., Espinosa de los Monteros A., Cole R.A., Loera S., de Vellis J. 1991. Laminin and s-laminin are produced and released by astrocytes, Schwann cells, and schwannomas in culture. *Glia* 4:11–24.
53. Chiu, K., Greer, C.A. 1996. Immunocytochemical analyses of astrocyte development in the olfactory bulb. *Dev Brain Res* 95: 28–37.
54. Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C., Mallowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P., Barres B.A. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120: 421–433.
55. Chung R.S., Hidalgo J., West A.K. 2008. New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J Neurochem* 104: 14–20.
56. Clemente, C.D., Windle, W.F. 1954. Regeneration of severed nerve fibers in the spinal cord of the adult cat. *J Comp Neurol* 101: 691-731.
57. Cocchia, D. 1981. Immunocytochemical localization of S-100 protein in the brain of adult rat: an ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 214: 529-540.
58. Cockburn, K., Rossant, J. 2010. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* 120: 995–1003.
59. coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J Neurosci Res* 48: 83–94.
60. Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Alvarez-Buylla, A. 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat Neurosci* 3: 1091-1097.
61. Costa M.R., Bucholz O., Schroeder T., Götz M. 2009. Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb cortex* 19 Suppl 1: i135–i143.
62. D'Ambrosio, R., Wenzel, J., Schwartzkroin, P.A., McKhann II, G.M., Janigro, D. 1998. Functional specialization and topographic segregation of hippocampal astrocytes. *J Neurosci*

- 18: 4425–4438.
63. Dahl, D., Rueger, D.C., Bignami, A. 1981. Vimentin, the 57,000 molecular weight protein of fibroblast filaments, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 24: 191-196.
 64. De Robertis, E., Gershenfeld, H.M. 1961. Submicroscopic morphology and function of glial cell. *Int Rev Neurobiol* 3: 1-65.
 65. De Vries, E. 1910. Bemerkungen zur ontogenie und vergleichenden anatomie des ckaustrums. *Folia Neurobiol* 4: 481–513.
 66. Deiters, O. 1865. Untersuchungen über Gehirn und Rückenmark des Menschen und der Säugethiere. M. Schultze, F. Vieweg, und U. Sohn, eds. Braunschweig.
 67. Denis-Donini, S., Glowinski, J., Prochiantz, A. 1984. Glial heterogeneity may define the three-dimensional shape of mouse mesencephalic dopaminergic neurones. *Nature* 307: 641-643.
 68. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17: 5046-5061.
 69. Dong, Y., Benveniste, E.N. 2001. Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180–190.
 70. Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L. y cols. 2008. Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135:749-762.
 71. Dutrochet, H. 1824. Recherches anatomiques et physiologiques sur la structure intime des animaux et des végétaux et sur leur motilité. Baillière, Paris.
 72. Eddleston, M., Mucke, L. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes- implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15–36.
 73. Emsley, J.G., Hagg, T. 2003. alpha6beta1 integrin directs migration of neuronal precursors in adult mouse forebrain. *Exp Neurol* 183: 273-285.
 74. Emsley, J.G., Macklis, J.D. 2006. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* 2: 175-186.
 75. Eng, L.F. Ghirnikar, R. S. 1994. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229–237.
 76. Eng, L.F. Kosek, J.C. 1974. Light and electron microscopic localization of the glial fibrillary acidic protein and S-100 protein by immunoenzymatic techniques. *Trans Am Soc Neurochem* 5:160.
 77. Eng, L.F., Bigbee, J.W. 1978. Immunohistochemistry of nervous system-specific antigens. *Adv Neurochem* 3: 43-98.
 78. Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A. Gerstl, B. 1971. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351-354.
 79. Espinosa de los Monteros, A., Zhang, M., DeVellis, J. 1993. O2A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U SA* 90: 50–54.
 80. Faeder, I.R., Salpeter, M.M. 1970. The uptake of L-glutamate by a stimulated insect nerve muscle preparation. *J Cell Biol* 46: 300-307.
 81. Faiz, M., Acarin, L., Villapol, S., Schulz, S., Castellano, B., Gonzalez, B. 2008. Substantial migration of SVZ cells to the cortex results in the generation of new neurons in the excitotoxically damaged immature rat brain. *Mol Cell Neurosci* 38: 170–182.
 82. Farina C., Aloisi F., Meinl E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28: 138–145.
 83. Farquhar, M.G., Hartmann, J.F. 1957. Neuroglial structure and relationships as revealed

- by electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 16: 18-39.
84. Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., Sofroniew, M.V. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24: 2143–2155.
85. Feig, S.L., Haberly, L.B. 2011. Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *J Comp Neurol* 519:1952–1969.
86. Feil, F., Wagner, J., Metzger, D., Chambon, P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 752–757.
87. Fok-Seang, J., Miller, R.H. 1992. Astrocyte precursors in neonatal rat spinal cord cultures. *J Neurosci* 12: 2751–2764.
88. Fok-Seang, J., Miller, R.H. 1994. Distribution and differentiation of A2B5+ glial precursors in the developing rat spinal cord. *J Neurosci Res* 37: 219–235.
89. Foo, L.C., Allen, N.J., Bushong, E.A., Ventura, P.B., Chung, W.S., Zhou, L., Cahoy, J.D., Daneman, R., Zong, H., Ellisman, M.H., Barres, B.A. 2011. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* 71: 799-811.
90. Franklin, R.J., Bayley, S.A., Milner, R., French-Constant, C., Blakemore, W.F. 1995. Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia- deficient areas of CNS white matter. *Glia* 13: 39–44.
91. Fredman, P., Magnani, J.L., Nirenberg, M., Ginsburg, V. 1984. Monoclonal antibody A2B5 reacts with many gangliosides in neuronal tissue. *Arch Biochem Biophys* 2: 661-666.
92. Frumkin, D., Wasserstrom, A., Kaplan, S., Feige, U., Shapiro, E. 2005. Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biology* 1:e50.
93. Gadea A., Lopez-Colome A.M. 2001. Glial transporters for glutamate, glycine and GABA I. Glutamate transporters. *J Neurosci Res* 63: 453–460.
94. Garcia-Abreu, J., Mendes, F.A., Onofre, G.R., De Freitas, M.S., Silva, L.C., Moura Neto, V., Cavalcante, L.A. 2000. Contribution of heparan sulfate to the non-permissive
95. Garcia-Abreu, J., Moura Neto, V., Carvalho, S.L., Cavalcante, L.A. 1995. Regionally specific properties of midbrain glia: I. Interactions with midbrain neurons. *J Neurosci Res* 40: 471-477.
96. García-Marín, V., García-López, P., Freire, M. 2007. Cajal's contributions to glia research. *Trends neurosci* 30:479-487.
97. Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., Sofroniew, M.V. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7: 1233-1241.
98. Ghandour, M.S., Langley, O.K., Labourdette, G., Vincendon, G., Gombos, G. 1981. Specific and artefactual cellular localization of S100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev. Neurosci* 4: 66-78.
99. Godina G. 1951. Istogenesi e differenziazione dei neuroni e degli elementi gliali della corteccia cerebrale. *Zeitsch Zellforsch* 36: 401–435.
100. Golden, J.A., Fields-Berry, S.C., Cepko, C.L. 1995. Construction and characterization of a highly complex retroviral library for lineage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5704–5708.
101. Golgi, C. 1885. Sulla fina anatomía degli organi centrali del sistema nervioso. *Riv Sper Fremiat Med Leg Alienazioni Ment*, 11:72-123
102. Golubev A.I. 1988. Glia and neuroglia relationships in the cerebral nervous system of the

- Turbellaria (electron microscopic data). *Fortschr Zool* 36:31–37.
103. Goslin, K., Banker, G. 1991. Rat hippocampal neurons in low-density culture. En: *Culturing nerve cells*. Banker, G. y Goslin, K., eds. Cambridge: MIT Press. 251-281.
 104. Griffin, R., Sustar, A., Bonvin, M., Binari, R., Del Valle Rodriguez, A., Hohl, A.M., Bateman, J.R., Villalta, C., Heffern, E., Gruwald, D., y cols. 2009. The twin spot generator for differential *Drosophila* lineage analysis. *Nat. Methods* 6: 600–602.
 105. Grinspan, J.B., Stern, J.L., Pustilnik, S.M., Pleasure, D. 1990. Cerebral white matter contains PDGF-responsive precursors to O2A cells. *J Neurosci* 10: 1866–1873.
 106. Grove, E. A., Williams, B. P., Li, D. Q., Hajihosseini, M., Friedrich, A., Price, J. 1993. Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* 117: 553-561.
 107. Guatteo, E., Stanness, K.A., Janigro, D. 1996. Hyperpolarization-activated ion currents in cultured rat cortical and spinal cord astrocytes. *Glia* 16: 196-209.
 108. Haas, B., Schipke, C.G., Peters, O., Sohl, G., Willecke, K., Kettenmann H. 2006. Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cereb Cortex* 16: 237–246.
 109. Hack, I., Bancila, M., Loulier, K., Carroll, P., Cremer, H. 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nat Neurosci* 5: 939-945.
 110. Hadjiceconomou, D., Rotkopf S., Alexandre C., Bell D.M., Dickson B.J., Salecker I. 2011. Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* 8: 260–266.
 111. Hampel, S., Chung, P., McKellar, C.E., Hall, D., Looger, L.L., Simpson, J.H. 2011. *Drosophila* Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nat Methods* 8: 253–259.
 112. Harrison, D.A., Perrimon, N. 1993. Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr Biol* 3: 424–433.
 113. Hartline D.K. 2011. The evolutionary origins of glia. *Glia* 59:1215-1236.
 114. Hatten, M.E., Liem, R.K., Shelanski, M.L., Mason, C.A. 1991. Astroglia in CNS injury. *Glia* 4: 233 – 243.
 115. Heck, N., Garwood, J., Schütte, K., Fawcett, J., Faissner, A. 2003. Astrocytes in culture express fibrillar collagen. *Glia* 41: 382–392.
 116. Hejnol A., Obst M., Stamatakis A., Ott M., Rouse G.W., Edgecombe G.D., Martinez P., Baguña J., Bailly X., Jondelius U., Wiens M., Müller W.E., Seaver E., Wheeler W.C., Martindale M.Q., Giribet G., Dunn C.W. 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Roy Soc B* 276:4261–4270.
 117. Herndon, R.M. 1964. The fine structure of the rat cerebellum. II. The stellate neurons, granule cells and glia. *J Cell Biol* 23: 277-293.
 118. His, W. 1887. Die entwicklung der ersten nervenbahnen beim menschlichen embryo. Übersichtliche Darstellung. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abth* 92: 368–378.
 119. His, W. 1888. Zur geschichte des gehirns sowie der centralen und peripherischen nervenbahnen beim menschlichen embryo. *Abh Kgl sachs Ges Wissensch math phys Kl* 24: 339–392.
 120. His, W. 1889a. Die neuroblasten und deren entstehung im embrionalen mark. *Abh Kgl sachs Ges Wissensch math phys Kl* 15: 311–372.
 121. His, W. 1889b. Die formentwicklung des menschlichen vorderhirns vom ende des ersten bis zum beginn des dritten monats. *Abh Kgl sachs. Ges Wissensch math phys Kl* 15: 673–736
 122. His, W. 1904. Die entwicklung des menschlichen gehirns während der ersten monate. Leipzig.

123. His, W., 1889a. Die Formentwicklung des menschlichen Vorderhirns vom Ende des ersten bis zum Beginn des dritten Monats. Abh. kgl. sachs Ges Wiss. Math Phys. Kl 15, 673–736.
124. His, W., 1889b. Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryonalen mark. Abh. kgl. sachs Ges Wiss. Math Phys. Kl 15, 311–372.
125. Holen, T. 2011. The ultrastructure of lamellar stack astrocytes. *Glia* 59: 1075–1083.
126. Holthoff K., Witte O.W. 2000. Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia* 29: 288–292.
127. Horridge G.A., Chapman D.M., MacKay B. 1962. Naked axons and symmetrical synapses in an elementary nervous system. *Nature Lond* 193:899–900.
128. Horwitz, I.S., Orkand, R.K. 1980. GABA inactivation at the crayfish neuromuscular junction. *J Neurobiol* 11: 447-458.
129. Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., Giaume C. 2008. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28: 5207–5217.
130. Houades, V., Rouach, N., Ezan, P., Kirchhoff, F., Koulakoff, A., Giaume, C. 2006. Shapes of astrocyte networks in the juvenile brain. *Neuron Glia Biology* 2: 3–14.
131. Howe, M.W., Feig, S.L., Osting, S.M.K., Haberly, L.B. 2008. Cellular and subcellular localization of Kir2.1 subunits in neurons and glia in piriform cortex with implications for K⁺ spatial buffering. *J Comp Neurol* 506: 877–893.
132. Hu, H., Tomasiwicz, H., Magnuson, T., Rutishauser, U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16: 735–743.
133. Huang Y.H. Bergles D.E. 2004. Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14: 346–352.
134. Huszti, Z. 1998. Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglial and cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 51: 551-558.
135. Israel, J.M., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Theodosis, D.T., Kettenmann, H. 2003. GABAA receptor-expressing astrocytes in the supraoptic nucleus lack glutamate uptake and receptor currents. *Glia* 44: 102–110.
136. Jankovski, A., Sotelo, C. 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *J Comp Neurol* 371: 376-396.
137. Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H. 2010. New Neurons Clear the Path of Astrocytic Processes for Their Rapid Migration in the Adult Brain. *Neuron* 67: 213–223.
138. Karwoski C.J., Lu H.K., Newman E.A. 1989. Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal Müller (glial) cells. *Science* 244: 578–580.
139. Kershman J. 1939. Genesis of microglia in the human brain. *Arch Neurol Psychiatr* 41: 24–50.
140. Kettenmann H., Ransom, B.R. 2005. The concept of neuroglia: a historical perspective. En *Neuroglia*. Eds. Kettenmann H. y Ransom B.R. Oxford University Press, Inc. New York. 1-16.
141. Kimelberg, H.K. 2009. Astrocyte heterogeneity or homogeneity?. En: *Astrocytes in (patho) physiology of the nervous system*. Eds. Parpura, V., Haydon. P.G. Springer Science+Business Media, LLC. New York. 1-25.
142. Kolker, S., Ahlemeyer, B., Huhne, R., Mayatepek, E., Kreioglstein, J., Hoffmann, G.F. 2001. Potentiation of 3-hydroxyglutarate neurotoxicity following induction of astrocytic

- iNOS in neonatal rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 13: 2115–2122.
143. Kölliker, A. 1863 *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*. 4th ed. Engelmann, Leipzig.
 144. Kölliker, A. 1896. *Handbuch der gewebelehre des menschen*, 6^a ed., vol II. Nervensystem des Menschen und der thiere. Engelmann, Leipzig.
 145. Kondo, T., and Raff, M. 2000. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 289: 1754–1757.
 146. Koyama H., Kusunoki T. 1993. Organization of the cerebral ganglion of the colonial ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. *J Comp Neurol* 338:549–559.
 147. Kozlova E.N., Lukanidin E. 1999. Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury. *Glia* 27: 249–258.
 148. Kriegstein, A. R., Götz, M. 2003. Radial glia diversity: A matter of cell fate. *Glia* 43: 37–43.
 149. Kristensen R.M. 1991. Loricifera. En: Harrison FW, Ruppert EE, editores. *Microscopic anatomy of invertebrates*, Vol. 4: Aschelminthes. New York: Wiley-Liss. pp 351–375.
 150. Kryspin-Exner, W. 1943. Beiträge zur morphologie der glia im nissl-bilde. *Z anat. entwicklungsgesch* 112: 389–416.
 151. Kuffler S.W. 1967. Neuroglial cells: Physiological properties and a potassium
 152. Kuga, N., Sasaki, T., Takahara, Y., Matsuki, N., Ikegaya, Y. 2011. Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo. *J Neurosci* 31: 2607–2614.
 153. Lagenaur, C., Sommer, I., Schachner, M. 1980. Subclass of astroglia recognized in mouse cerebellum by monoclonal antibody. *Dev Biol* 79: 367–379.
 154. Larner, A.J., Johnson, A.R., Keynes, R.J. 1995. Regeneration in the vertebrate central nervous system: phylogeny, ontogeny, and mechanisms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 70: 597–619.
 155. Laterra J., Guerin C., Goldstein G.W. 1990. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. *J Cell Physiol* 144: 204–215.
 156. Law, A.K., Pencea, V., Buck, C.R., Luskin, M.B. 1999. Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes. *Dev Biol* 216: 622–634.
 157. Le Douarin, N., Barq, G. 1969. Use of Japanese quail cells as “biological markers” in experimental embryology. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 269: 1543–1546.
 158. Lee, Y., Su, M., Messing, A Brenner, M. 2006. Astrocyte heterogeneity revealed by expression of a GFAP-LacZ transgene. *Glia* 687: 677–687.
 159. Legué, E., Nicolas, J.F. 2005. Hair follicle renewal: organization of stem cells in the matrix and the role of stereotyped lineages and behaviors. *Development* 132: 4143–4154.
 160. Lehre K.P., Levy L.M., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., Danbolt N.C. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15: 1835–1853.
 161. Lein E.S., Hawrylycz M.J., Ao N. y cols. 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445: 168–176.
 162. Lenhossék, M. Von. 1893. *Der feinere bau des nervensystems im lichte neuester forschung*. Berlin: Fischers’s Medicinische Buchhandlung H. Kornfield.
 163. Lenz T.L., Barnett R.J. 1965. Fine structure of the nervous system of *Hydra*. *Am Zool* 5:341–356.
 164. Levi, G., Aloisi, F., Wilkin, G.P.1987. Differentiation of cerebellar bipotential glial precursors into oligodendrocytes in primary culture: developmental profile of surface

- antigens and mitotic activity. *J Neurosci Res* 18: 407–417.
165. Levison, S.W., Goldman, J.E. 1997. Multipotential and lineage restricted precursors
166. Levison, S.W., McCarthy, K.D. 1991. Astroglia in culture. En: *Culturing nerve cells*. Banker, G. y Goslin, K., eds. Cambridge: MIT Press. 309-336.
167. Levitt, P., Cooper, M.L., Rakic P. 1981. Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey. An ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J Neurosci* 1: 27–39.
168. Levitt, P., Rakic, P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193: 815–840.
169. Levitt, P., Rakic, P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193: 815-840.
170. Liesi P. 1985. Laminin-immunoreactive glia distinguish regenerative adult CNS systems from non-regenerative ones. *EMBO J* 4: 2505–2511.
171. Liesi P., Dahl D., Vaheri A. 1983. Laminin is produced by early rat astrocytes in primary culture. *J Cell Biol* 96: 920–924.
172. Liesi P., Kirkwood T., Vaheri A. 1986. Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain. *Exp Cell Res* 163: 175–185.
173. Liesi P., Silver J. 1988. Is astrocyte laminin involved in axon guidance in the mammalian CNS? *Dev Biol* 130: 774–785.
174. Littlewood D.T.J., Bray R.A. 2001. *Interrelationships of the platyhelminthes*. London: Taylor & Francis. 367 p.
175. Liu, X., Bolteus, A.J., Balkin, D.M., Henschel, O., Bordey, A. 2006. GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. *Glia* 54: 394-410.
176. Liuzzi, F.J., Lasek, R.J. 1987. Astrocytes block axonal regeneration in mammals by activating the physiological stop pathway. *Science* 237: 642-645.
177. Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., Lichtman, J.W. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450: 56–62.
178. Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., Lichtman, J.W. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450: 56–62.
179. López-Bayghen, E., Rosas, S., Castelan, F., Ortega, A. 2007. Cerebellar Bergmann glia: an important model to study neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biol* 3: 155-167.
180. Ludwin, S.K., Kosek, J.C., Eng, L.F. 1976. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J Comp Neurol* 165: 197-208.
181. Lugaro, E. 1907. Sulle funzioni della nevroglia. *Riv Patol Nerv Ment.* 12:225–233.
182. Luse, S.A. 1956. Electron microscopic observations of the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2:531-542.
183. Luskin, M. B., Pearlman, A. L., Sanes, J. R. 1988. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1: 635-647.
184. Luskin, M.B., Parnavelas, J.G., Barfield, J.A. 1993. Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J Neurosci* 13: 1730-1750.

185. Mackie G.O. 2003. Central neural circuitry in the jellyfish *Aglantha*. *Neurosignals* 13:5–19.
186. Macnab L.T., Pow D.V. 2007. Expression of the exon 9-skipping form of EAAT2 in astrocytes of rats. *Neuroscience* 150: 705–711.
187. Magini, G. 1888. Nevroglia e cellule nervose cerebrali nei feti. Atti del dodicesimo congresso della associazione medica italiana. vol. 1. Tipografia Fratelli Fusi, Pavia. 281–291
188. Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Götz, M. 2003. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37: 751–764.
189. Marins, M., Xavier, A.L.R., Viana, N.B., Fortes, F.S.A., Fróes M.M., Menezes, J.R.L. 2009. Gap junctions are involved in cell migration in the early postnatal subventricular zone. *Dev Neurobiol* 69: 715–730.
190. Marshall, C.A.G., Suzuki, S.O., Goldman, J.E. 2003. Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia* 43:52–61.
191. Martinez P., Bagañà J., Bailly X., Jondelius U., Wiens M., Müller W.E., Seaver E., Wheeler W.C., Martindale M.Q., Giribet G., Dunn C.W. 2009. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc Roy Soc B* 276:4261–4270.
192. Mason, H.A., Ito, S., Corfas, G. 2001. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21: 7654–7663.
193. Matthias, K., Kirchhoff, F., Seifert, G., Hüttmann, K., Matyash, M., Kettenmann, H., Steinhäuser, C. 2003. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23: 1750–1758.
194. Matthiessen H.P., Schmalenbach C., Muller H.W. 1989. Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 2: 177–188.
195. Matus, A., Mughal, S. 1975. Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain. *Nature* 258:746–748.
196. McCarthy M., Turnbull D.H., Walsh C.A., Fishell G. 2001. Telencephalic neural progenitors appear to be restricted to regional and glial fates before the onset of neurogenesis. *J Neurosci* 21: 6772–6781.
197. mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. *Proc R Soc Lond B* 168:1–21.
198. Meinertzhagen I.A., Lemaire P., Okamura Y. 2004. The neurobiology of the ascidian tadpole larva: Recent developments in an ancient chordate. *Annu Rev Neurosci* 27:453–485.
199. Mendis, D.B., Malaval, L., Brown, I.R. 1995. SPARC, an extracellular matrix glycoprotein containing the follistatin module, is expressed by astrocytes in synaptic enriched regions of the adult brain. *Brain Res* 676: 69–79.
200. Mi, H., Barres, B.A. 1999. Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J Neurosci* 19: 1049–1061.
201. Miller D.J., Ball E.E. 2006. Animal evolution: The enigmatic phylum placozoa revisited. *Curr Biol* 15:R26–R28.
202. Miller, R.H., Raff, M.C. 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci* 4:585–592.
203. Montgomery, D.L. 1994. Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. *Vet Pathol*

- 31: 145-167.
204. Montgomery, D.L. 1994. Astrocytes: forms, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol* 31: 145–167.
205. Moore, B.W. 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 6:739-744.
206. Mori, S., Leblond, C.P. 1969. Electron microscopic features and proliferation of astrocytes in the corpus callosum of the rat. *J Comp Neurol* 137: 197-226.
207. Mugnaini, E., Forströner, P.F. 1967. Ultrastructural studies on the cerebellar histogenesis. I. Differentiation of granule cells and development of glomeruli in the chick embryo. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Abt Histochem* 77: 115–143.
208. Mugnaini, E., Walberg, F. 1964. Ultrastructure of neuroglia. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 37: 194-236.
209. Muir E.M., Adcock K.H., Morgenstern D.A., Clayton R., von Stillfried N., Rhodes K., Ellis C., Fawcett J.W., Rogers J.H. 2002. Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 100: 103–117.
210. Müller, H. 1851. Zur histologie der netzhaut, *Z. Wissenschaft. Zool.* 3:234-237.
211. Müller, W. 1868. Ueber Stammsentwicklung des Sehorgans der Wirbelthiere. Leipzig.
212. Mulligan S.J., MacVicar B.A. 2004. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431: 195–199.
213. Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., Sofroniew, M.V. 2006. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 129: 2761–2772.
214. Nagy J.I., Patel D., Ochalski P.A., Stelmack G.L. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88: 447–468.
215. Nedergaard, M., Ransom, B. Goldman, S.A. 2003. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26: 523-530.
216. Neugebauer K.M., Tomaselli K.J., Lilien J., Reichardt L.F. 1988. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J Cell Biol* 107: 1177–1187.
217. Newman E.A. 1986. High potassium conductance in astrocyte endfeet. *Science* 233: 453–454.
218. Ng, K.L., Li, J.D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., Zhou, Q.Y. 2005. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923-1927.
219. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., Chédotal, A. 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24: 1497–1506.
220. Nishida, H. 1987. Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev Biol* 121, 440-453.
221. Nishiyama, A., Yang, Z., Butt, A. 2005. Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?. *J Anat* 207: 687-93.
222. Nissl, F. 1892. Über experimentell erzeugte veränderungen an den vorderhornzellen des rückenmarks bei kaninchen mit demonstration mikroskopischer Präparate. *Allg Z Psychiat* 48: 675-682.
223. Nissl, F. 1894. Über rosins neue färbemethode des gesamten nervensystems und dessen Bemerkungen über ganglienzellen. *Neurol Zbl* 13: 98-106, 141-144
224. Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M.D., Riddle, P. 1988. Platelet-derived

- growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 333: 560–562.
225. Noctor, S.C., Flint A.C., Weissman T.A., Dammerman R.S., Kriegstein A.R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714–720.
 226. Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C. G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: A tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33: 72–86.
 227. Norton, W.T., Aquino, D.A., Hozumi, I., Chiu, F.C., Brosnan, C.F. 1992. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17: 877–885.
 228. Ojeda S.R., Ma Y.J., Lee B.J., Prevot V. 2000. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Recent Prog Horm Res* 55: 197–223.
 229. Oliet S.H., Piet R., Poulain D.A. 2001b. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292: 923–926.
 230. Olsen, M.L., Campbell, S.L., Sontheimer, H. 2007. Differential distribution of Kir4.1 in spinal cord astrocytes suggests regional differences in K⁺ homeostasis. *J Neurophysiol* 98: 786–793.
 231. Paemeleire K., Leybaert L. 2000a. ATP-dependent astrocyte-endothelial calcium signaling following mechanical damage to a single astrocyte in astrocyte-endothelial co-cultures. *J Neurotrauma* 17: 345–358.
 232. Palay, S.L., McGee-Russell, S.M., Spencer, G.J., Grillo, M.A. 1962. Fixation of neural tissues for elevation microscopy by perfusión with solutions of osmium tetroxide. *J Cell Biol* 12: 385–410.
 233. Parnavelas, J.G. 1999. Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 156: 418–429.
 234. Pastor, A., Chvatal, A., Sykova, E., Kettenmann, H. 1995. Glycine- and GABA-activated currents in identified glial cells of the developing rat spinal cord slice. *Eur. J. Neurosci.* 7: 1188–1198.
 235. Pellegrini G., Rossier C., Magistretti P.J., Martin J.L. 1996. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res Mol Brain Res* 38: 191–199.
 236. Pellerin L., Magistretti P.J. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10625–10629.
 237. Penfield, W. 1932. Neuroglia, normal and pathological. En *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. W. Penfield, ed. Vol. 2: 423–479. Paul B. Hoeber. New York, NY.
 238. Perea, G., Araque, A. 2007. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083–1086.
 239. Peretto, P., Merighi, A., Fasolo, A., Bonfanti, L. 1997. Glial tubes in the rostral migratory stream of the adult rat. *Brain Res Bull* 42: 9–21.
 240. Pfeiffer-Guglielmi B., Fleckenstein B., Jung G., Hamprecht B. 2003. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85: 73–81.
 241. Piatkevich, K.D., Hult, J., Subach, O.M., Wu, B., Abdulla, A., Segall, J.E., Verkhusa, V.V. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 5369–5374.
 242. Piet R., Vargova L., Sykova E., Poulain D.A., Oliet S.H. 2004. Physiological contribution

- of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2151–2155.
243. Platel, J.C., Dave, K.A., Bordey, A. 2008. Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586: 3739–3743
244. Price, J., Hynes R.O. 1985. Astrocytes in culture synthesize and secrete a variant form of fibronectin. *J Neurosci* 5: 2205–2211.
245. Price, J., Thurlow, L. 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Development* 104: 473–482.
246. Pringle, N.P., Guthrie, S., Lumsden, A., Richardson, W.D. 1998. Dorsal spinal cord neuroepithelium generates astrocytes but not oligodendrocytes. *Neuron* 20: 883–893.
247. Prinz, M., Mildner, A. 2011. Microglia in the CNS: Immigrants from another world. *Glia* 59: 177–187.
248. Privat, A., Gimenez-Ribotta, M., Ridet, J.L. 1995. Morphology of astrocytes. En: *Neuroglia*. Eds. Kettenmann, H., Ransom, B.R. Oxford University Press. New York. 3–22.
249. Radojicic T., Pentreath V.W. 1979. Invertebrate glia. *Progr Neurobiol* 12:115–179.
250. Raff, M.C., Abney, E.R., Cohen, J., Lindsay, R., Noble, M. 1983a. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides and growth characteristics. *J Neurosci* 3: 1289–1300.
251. Raff, M.C., Miller R. H., Noble, M. 1983b. A glial progenitor cells that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390–396.
252. Rakic, P. 1971a. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol* 141: 283–312.
253. Rakic, P. 1971b. Guidance of neurons migrating in the fetal monkey neocortex. *Brain Res* 33: 471–476
254. Rakic, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145: 61–84.
255. Rakic, P. 1995. Radial glial cells scaffolding for brain construction. H. Kettermann, B.R. Ransom (Eds.). *Neuroglial cells*, Oxford University Press, New York/Oxford. 746–762.
256. Rakic, P. 2003. Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43: 19–32.
257. Rao, M.S. 1999. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec* 257: 137–148.
258. Rao, M.S., Mayer-Proschel, M. 1997. Glial-restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev Biol* 188: 48–63.
259. Rao, M.S., Noble, M., Mayer-Proschel, M. 1998. A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3996–4001.
260. Regan, M.R., Huang, Y.H., Kim, Y.S., Dykes-Hoberg, M.I., Jin, L., Watkins, A.M., Bergles, D.E., Rothstein, J.D. 2007. Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci* 27: 6607–6619.
261. Rehkämper G., Storch V., Alberti G., Welsch U. 1989. On the fine structure of the nervous system of *Tubiluchus philippinensis* (Tubiluchidae, Priapulida). *Acta Zool* 70:111–120.
262. Reichenbach A., Wolburg, H. 2005. Astrocytes and ependymal glia. En *Neuroglia*. Eds. Kettenmann H. y Ransom B.R. Oxford University Press, Inc. New York. 19–35.
263. Reichenbach, A., Robinson, S.R. 1995. Ependymoglia and ependymoglia-like cells. En:

- Neuroglia. Eds. Kettenmann, H., Ransom, B.R. Oxford University Press. New York. 58-84.
264. Reier, P.J., Stensaas, L.J., Guth, J. 1983. The astrocytic scar as an impediment to regeneration in the central nervous system. In: Spinal cord reconstruction. Kao, C.C., Bunge, R.P., Reier, P.J., eds. New York: Raven. 163-195.
 265. Reilly, J.F., Kumari, V.G. 1996. Alterations in fibroblast growth factor receptor expression following brain injury. *Exp Neurol* 140:139–150.
 266. Remak, R. 1838. PhD thesis, University of Berlin..
 267. Retzius, G. 1893. Die Cajal'schen zellen der grosshirnrinde beim menschen und bei säugethieren. En: *Biologische Untersuchungen*, vol. 5. Stockholm: Samson y Wallin 1-8
 268. Richardson, W.D., Young, K.M., Tripathi, R.B., McKenzie, I. 2011. NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron* 70: 661–673.
 269. Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20: 570–577.
 270. Rio Hortega P. D., Penfield W. 1927. Cerebral cicatrix. The reaction of newborn neuroglia and microglia to brain wounds. *Bull Johns Hopkins Hosp* 41:278-303.
 271. Rio Hortega, P. 1917. Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Trab Lab Invest Biol* 15: 367-378.
 272. Rio Hortega, P. 1928. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la neuroglía. *Mem Soc Esp Hist Nat* 14: 5-122.
 273. Rio Hortega, P. D. 1921. Estudios sobre la neuroglia. *Bol Real Soc Esp Hist Nat*, 21:65-92.
 274. Rio Hortega, P. D. 1922. ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Bol Soc Esp Biol*, 10:25-29.
 275. Rio Hortega, P. D. 1933. Arte y oficio de la ciencia histológica. *Rev Res Estud Madrid*, 4:191-206.
 276. Rio Hortega, P.D. 1919. El tercer elemento de los centros nerviosos. *Biol Soc Esp Biol* 9: 69–120.
 277. Rio Hortega, P.D. 1925. Condrioma y granulaciones específicas de las células neuróglícas. *Bol R Soc Esp Hist Nat* 25: 34-55.
 278. Robertson, W.F. 1897. The normal histology and pathology of the neuroglia. *J Ment Sci* 43:733-752.
 279. Robertson, W.F. 1899. On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue elements of the central nervous system (platinum method). *Scot Med Surg J* 4:23.
 280. Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., Amat, P. 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247: 89–164.
 281. role of the midline glia to the growth of mid- brain neurites. *Glia* 29: 260–272.
 282. Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., Giaume C., 2011. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 18442-18446.
 283. Rudge J.S., Alderson R.F., Pasnikowski E., McClain J., Ip N.Y., Lindsay R.M. 1992. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci* 4: 459–471.
 284. Rudge, J.S., Silver, J.1990. Inhibition of neurite growth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* 10: 3594-3603.
 285. Saijo, K., Glass, C.K. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11: 775-787.
 286. Salipante, S.J., Horwitz, M.S. 2006. Phylogenetic fate mapping. *PNAS* 103: 5448-5453.

287. Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., Nicolas, J.F. 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5: 3133–3142.
288. Sawamura, S., Sawada, M., Ito, M., Nagatsu, T., Nagatsu, I., Suzumura, A., Shibuya, M., Sugita, K., Marunouchi, T. 1995. The bipotential glial progenitor cell line can develop into both oligodendrocytes and astrocytes in the mouse forebrain. *Neurosci Lett* 188: 1–4.
289. Scemes, E., Spray, D.C. 2009. Connexin expression (gap junctions and hemichannels) in astrocytes. En: *Astrocytes in (patho)physiology of the nervous system*. Eds. Parpura, V., Haydon. P.G. Springer Science+Business Media, LLC. New York. 107-150.
290. Schachner, M., Hedley-White, E.T., Hsu, D.W., Schoonmaker, G., Bignami, A. 1977. Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labelling. *J Cell Biol* 75: 67-73.
291. Schaper, A. 1897. The earliest differentiation in the central nervous system of vertebrates. *Science* 5:430–431.
292. Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchhoff, F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 15: 1270–1272.
293. Schmechel, D.E., Rakic, P. 1979. Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. *Nature* 227: 303–305.
294. Schnitzer, J., Franke, W.W., Schachner, M. 1981. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous systems. *J Cell Biol* 90:435-447.
295. Seidman, K.J., Teng, A.L., Rosenkopf, R., Spilotro, P., Weyhenmeyer, J.A. 1997. Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell line. *Brain Res* 753: 18–26.
296. Seifert, G., Steinhäuser, C. 1995. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *Eur J Neurosci* 7: 1872–1881.
297. Shea T.B., Beermann M.L., Nixon R.A. 1992. Sequential effects of astroglial-derived factors on neurite outgrowth: initiation by protease inhibitors and potentiation by extracellular matrix components. *J Neurosci Res* 31: 309–317.
298. Sjöstrand J. 1965. Proliferative changes in glial cells during nerve regeneration. *Z Zellforsch mikrosk Anat* 68: 481-493.
299. Skoff, R.P., Knapp, P.E. 1995. The origins and lineages of macroglial cells. En: *Neuroglia*. Eds. Kettenmann, H., Ransom, B.R. Oxford University Press. New York. 135-148.
300. Smith G.M., Rutishauser U., Silver J., Miller R.H. 1990. Maturation of astrocytes in vitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth. *Dev Biol* 138: 377–390.
301. Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., Parent, A., Saghatelian, A. 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 29: 4172–4188.
302. Snippert, H.J., van der Flier, L.G., Sato, T., van Es J.H., van den Born, M., Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., van Rheenen, J., Simons, B.D., Clevers, H. 2010. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* 143: 134–144.
303. Sofroniew, M.V., Howe, C.L., Mobley, W.C. 2001. Nerve growth factor signaling, neuroprotection and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217–1281.
304. Sommer, I., Lagenaur, C., Schachner, M. 1981. Recognition of Bergmann glial and ependymal cells in the mouse nervous system by monoclonal antibody. *J Cell Biol* 90: 448-458.

305. Spassky, N., Merkle, F.T., Flames, N., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25: 10–18.
306. Spemann, H., Mangold, H. 1924. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Wilhelm Roux Arch Entw Mech Org* 100: 599–638.
307. Streit, W.J. 2005. Microglial cells. En *Neuroglia*. Eds. Kettenmann H. y Ransom B.R. Oxford University Press, Inc. New York. 60-71.
308. Struzynska L., Bubko I., Walski M., Rafalowska U. 2001. Astroglial reaction during the early phase of acute lead toxicity in the adult rat brain. *Toxicology* 165: 121–131.
309. Su, Z., Cheng, H. 2010. Olfactory ensheathing cells: Biology in neural development and regeneration. *Prog neurobiol* 92: 517-532.
310. Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G., Thomson, J.N., Von Ehrenstein, G. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64-119.
311. Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R.H., Jakobs, T.C. 2010. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *J Neurosci* 30: 14008-14019.
312. Sundholm-Peters, N.L., Yang, H.K., Goings, G.E., Walker, A.S., Szele, F.G. 2005. Subventricular zone neuroblasts emigrate toward cortical lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 1089-1100.
313. Suzuki, S.O., Goldman, J.E. 2003. Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci* 23: 4240-4250.
314. Swoboda, P., Gal, S., Hohn, B., Puchta, H. 1994. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *EMBO J* 13: 484–489.
315. Szuchet, S. 1995. The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. En: *Neuroglia*. Eds. Kettenmann, H., Ransom, B.R. Oxford University Press. New York. 23-43.
316. Takata, N., Hirase, H. 2008. Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PLoS ONE* e2525, 3.
317. Tatsumi, K., Takebayashi, H., Manabe, T., Tanaka, K.F., Makinodan, M., Yamauchi, T., Makinodan, E., Matsuyoshi, H., Okuda, H., Ikenaka, K., and Wanaka, A. 2008. Genetic fate mapping of Olig2 progenitors in the injured adult cerebral cortex reveals preferential differentiation into astrocytes. *J Neurosci Res* 86: 3494–3502.
318. Terrazas, P. 1897. La neuroglia del cerebelo. *Rev Trimest Microgr*, 1.
319. Thomas, L.B., Gates, M.A., Steindler, D.A. 1996. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia* 17: 1-14.
320. Tokita, Y., Keino, H., Matsui, F., Aono, S., Ishiguro, H., Higashiyama, S., Oohira, A. 2001. Regulation of Neuregulin Expression in the Injured Rat Brain and Cultured Astrocytes. *J Neurosci* 21:1257-1264.
321. Tomaselli K.J., Neugebauer K.M., Bixby J.L., Lilien J., Reichardt L.F. 1988. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* 1: 33–43.
322. Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Lim, D.A., Álvarez-Buylla, A. 2003. Postnatal Development of Radial Glia and the Ventricular Zone (VZ): a Continuum of the Neural Stem Cell Compartment. *Cereb Cortex* 13: 580-587.
323. Trotter, J., Schachner, M. 1989. Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain Res Dev Brain*

- Res 46: 115–122.
324. Vaca K., Wendt E. 1992. Divergent effects of astroglial and microglial secretions on neuron growth and survival. *Exp Neurol* 118: 62–72.
 325. Valverde, F., López-Mascaraque, L. 1991. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307: 658–674.
 326. Ventura R., Harris K.M. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19: 6897–6906.
 327. Vincent, C.A., Carpenter, R., Coen, E.S. 1995. Cell lineage patterns and homeotic gene activity during Antirrhinum flower development. *Curr Biol* 5: 1449–1458
 328. Virchow, R. 1846. Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gerhirnventrikel. *Allg. Z. Psychiatr.*, 3:242.
 329. Virchow, R. 1856. *Gesammelte Abbildung zur wissenschaftlichen Medizin*, Verlag von Meidinger Sohn & Comp.
 330. Virchow, R. 1858. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische gewebelehre*. Berlin: Verlag von August Hirschwald.
 331. Voigt T. 1989. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glial into astrocytes. *J Comp Neurol* 289: 74–88.
 332. Walz, W. 2000. Controversy surrounding the existence of discrete functional classes of astrocytes in adult gray matter. *Glia* 31: 95–103.
 333. Wang, D.D., Bordey, A. 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 86: 342–367.
 334. Wasserstrom, A., Adar, R., Shefer, G., Frumkin, D., Itzkovitz, S., Stern, T., Shur, I., Zangi, L., Kaplan, S., Harmelin, A. y cols. 2008. Reconstruction of cell lineage trees in mice. *PLoS ONE* 3: p. e1939
 335. Weigert, C. 1895. *Beiträge zur Kenntniss der normalen menschlichen neuroglia*. Frankfurt am main, Weisbrod.
 336. Wells G.M., Catlin G., Cossins J.A., Mangan M., Ward G.A., Miller K.M., Clements J.M. 1996. Quantitation of matrix metalloproteinases in cultured rat astrocytes using the polymerase chain reaction with a multi-competitor cDNA standard. *Glia* 18: 332–340.
 337. West H., Richardson W.D., Fruttiger M. 2005. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132: 1855–1862.
 338. Westenbroek, R.E., Bausch, S.B., Lin, R.C.S., Franck, J.E., Noebels, J.L. Catterall, W.A. 1998. Upregulation of L-Type Ca²⁺ Channels in Reactive Astrocytes after Brain Injury, Hypomyelination, and Ischemia. *J Neurosci* 18: 2321–2334.
 339. Whitman, C.O. 1887. A contribution to the history of germ layers in Clepsine. *J Morphol* 1: 105–182.
 340. Whitman, M.C., Fan, W., Relat, L., Rodriguez-Gil, D.J., Greer, C.A. 2009. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol* 516: 94–104.
 341. Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18: 779–791.
 342. Wilhelmsson U., Bushong E.A., Price D.L., Smarr B.L., Phung V., Terada M., Ellisman M.H., Pekny M. 2006. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci. USA* 103: 17513–17518.
 343. Wittkowski, W. 1998. Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microsc Res Techniq* 41: 29–42.
 344. Wrona F.J., Koopowitz H. 1998. Behavior of the rhabdocoel flatworm *Mesostoma ehrenbergii* in prey capture and feeding. *Hydrobiologia* 383:35–40.

-
345. Yeh, T.H., Lee da, Y., Gianino, S.M., Gutmann, D.H. 2009. Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)-regulated glial proliferation. *Glia* 57: 1239-1249.
346. Young, J.Z. 1991. The concept of neuroglia. *Ann NY Acad Sci* 633: 1-18.
347. Zhang C., Harder D.R. 2002. Cerebral capillary endothelial cell mitogenesis and morphogenesis induced by astrocytic epoxyeicosatrienoic Acid. *Stroke* 33: 2957–2964.
348. Zhang, S.C., Lipsitz, D., Duncan, I.D. 1998. Self-renewing canine oligodendroglial progenitor expanded as oligospheres. *J Neurosci Res* 54: 181–190.
349. Zhang, Z., Chopp, M. 2002. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 12: 62–66.
350. Zhu, X., Hill, R.A., Dietrich, D., Komitova, M., Suzuki, R., Nishiyama, A.. 2011. Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development* 138: 745-753.
351. Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D., Luo, L. 2005. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* 121: 479–492.
352. Zonta M., Angulo M.C., Gobbo S., Rosengarten B., Hossmann K.A., Pozzan T., Carmignoto G.. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 2003 6: 43–50.

ANEXOS

Anexo I: Soluciones

Paraformaldehído al 4% en PB 0,1 M

Esta solución se prepara mezclando en el momento de su uso partes iguales de una solución de PFA al 8% en agua destilada y PB 0,2 M. La receta del PB 0,2 M consiste en la mezcla de 21,9 g de Na_2HPO_4 y 6,35 g de H_2NaPO_4 con agua destilada llevándolo a un volumen final de un litro.

Agar para corte en vibrátomo

Para la preparación de dicho agar se mezclan 3,5 g de agar-agar tipo europeo (Panreac) con 8 g de sacarosa enrasando a 100 mL con agua destilada. Esta mezcla se calienta hasta su ebullición (90 °C) al baño maría. Después se deja enfriar y se conserva a 4 °C.

Tampón fosfato salino (PBS).

El PBS contiene 8,2 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,2 g de KH_2PO_4 y 1,14 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ enrasado a un litro con agua destilada y ajustado a pH 7,4 con NaOH.

Electroforesis, geles de Agarosa y TAE 50 X

Se disolvieron 0,4 gramos de agarosa D-1 (Pronadisa) en 30 mL de agua destilada y se llevaron a ebullición en un microondas. Después se añadieron 0,8 mL de tampón TAE 50X (este tampón salino permite la conducción de la corriente eléctrica), 1 μL del marcador de ácidos nucleicos GelRed (Biotium; sustituye al Bromuro de Etidio ya que debido a que no penetra en las células, no tiene los efectos cancerígenos atribuidos al Bromuro de Etidio) y se enrasó a 40 mL con agua destilada.

Para la preparación del TAE 50X se siguió la siguiente receta: 242 g de Tris Base, 57,1 mL de ácido acético glacial y 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8.0) enrasando con agua destilada hasta 1 L.

Una vez preparada la mezcla de agarosa se depositó en una cubeta, se puso un peine de plástico para formar 8 pocillos y se dejó enfriar. Después se añadió TAE 1X hasta cubrir el gel y se aplicaron cuidadosamente con una pipeta P-20 los distintos fragmentos de DNA diluidos en tampón de carga (Fermentas). Este tampón contiene dos indicadores de tamaño: Xileno Cianol FF (4160 pb) y azul de bromofenol (370 pb). También se aplicaron 3 μL de GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) como patrón de tamaños. Después se dejó migrar la muestra durante un tiempo variable próximo a 40 minutos aplicando un voltaje de 200 V hasta que el bromofenol se encontraba a más de 2/3 del gel.

Medio Luria Broth (LB)

La preparación del LB se hizo añadiendo a 800 mL de agua destilada, 10 g de Bacto-trip-

tona (Becton, Dickinson and Company), 5 g de extracto de levadura (Acumedia - Neogen Corp.) y 10 g de NaCl y ajustando el pH a 7,5 con NaOH. Después se enrasó a 1 L con agua destilada y se esterilizó en autoclave.

Placas de agar bacteriológicas con antibiótico de selección

Las placas de agar fueron preparadas añadiendo 6 g de agar bacteriológico (Acumedia - Neogen Corp.) en 400 mL de LB y llevando a ebullición en microondas. Después se deja enfriar a unos 40 °C, se pone el antibiótico correspondiente y se echa en placas Petri de plástico para bacterias, dejando enfriar hasta que solidifique.

Anexo II: Material suplementario

Video 1.- Migración de precursores gliales en cultivos de rodajas cerebrales.

Video 2.- Reconstrucción tridimensional de las capas bulbares GL y ONL.

Video 3.- Migración de neuroblastos sobre monocapas de BO.

Video 4.- Migración de neuroblastos sobre monocapas de RMS.

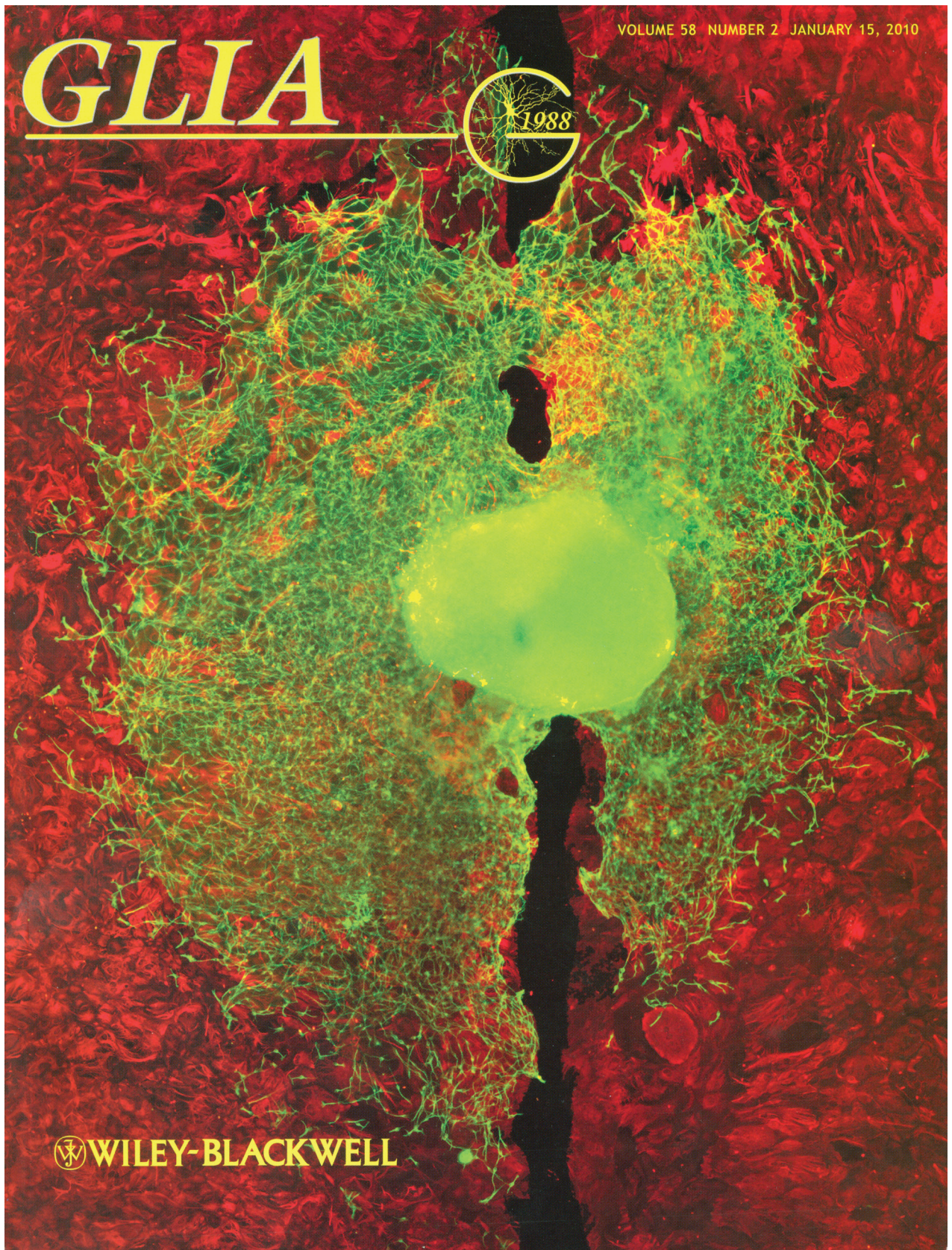
Video 5.- Migración de neuroblastos sobre monocapas de Cx.

Video 6.- Rutas de migración de neuroblastos sobre monocapas de BO.

Video 7.- Rutas de neuroblastos sobre monocapas de RMS.

Video 8.- Rutas de neuroblastos sobre monocapas de Cx.

Anexo III: Publicaciones



Different Astroglia Permissivity Controls the Migration of Olfactory Bulb Interneuron Precursors

JORGE GARCÍA-MARQUÉS,¹ JUAN A. DE CARLOS,¹ CHARLES A. GREER,^{2,3} AND LAURA LÓPEZ-MASCARAQUE^{2*}

¹Instituto Cajal, CSIC, Av. Dr. Arce, 37, 28002, Madrid, Spain

²Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

³Department of Neurobiology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

KEY WORDS

neurogenesis; astrocyte cultures; RT-PCR; subventricular zone; heterogeneity

ABSTRACT

The rostral migratory stream (RMS) is a well defined migratory pathway for precursors of olfactory bulb (OB) interneurons. Throughout the RMS an intense astroglial matrix surrounds the migratory cells. However, it is not clear to what extent the astroglial matrix participates in migration. Here, we have analyzed the migratory behavior of neuroblasts cultured on monolayers of astrocytes isolated from areas that are permissive (RMS and OB) and nonpermissive (cortex and adjacent cortical areas) to migration. Our results demonstrate robust neuroblast migration when RMS-explants are cultured on OB or RMS-astrocytes, in contrast to their behavior on astroglia derived from nonpermissive areas. These differences, mediated by astrocyte-derived nonsoluble factors, are related to the overexpression of extracellular matrix and cell adhesion molecules, as revealed by real-time qRT-PCR. Our results show that astroglial heterogeneity could play a significant role in migration within the RMS and in cell detachment in the OB. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Neuroblasts migrating tangentially through the rostral migratory stream (RMS) are flanked by astrocytes, which delineate the migratory pathway (Doetsch et al., 1997; Jankovski and Sotelo, 1996; Peretto et al., 1997; Thomas et al., 1996). Although the neuroblast–glia relationship is less evident in the olfactory bulb (OB), similar appositions may extend into the OB where there is a high density of astrocytes (Emsley and Macklis, 2006). Despite this intimate relationship, the role of glial cells in migration remains controversial. Mature astrocytes are not present during the peak of OB interneuron neurogenesis (Law et al., 1999), although radial glia could provide a cellular scaffold for the early RMS (Alves et al., 2002). *In vitro*, glial cells are not required for chain migration (Wichterle et al., 1997), although they release a soluble substance that induces migration (Mason et al. 2001). Moreover, bidirectional communication between astrocytes and neuroblasts may control the glutamate and GABA levels implicated in subventricular zone (SVZ) and RMS migratory behavior (Bolteus and Bordey, 2004; Platel et al., 2008).

The mechanisms controlling neuroblasts restriction to the RMS are also poorly understood; neuroblasts are restricted to the RMS and do not colonize surrounding brain areas other than in a few injury-related examples (Faiz et al., 2008). Migrating neuroblasts stop at the SVZ/white matter border and turn back into the SVZ, suggesting a boundary between permissive/nonpermissive migratory zones (Suzuki and Goldman, 2003). The expression of extracellular matrix (ECM) molecules could prevent neuroblast migration into contiguous regions (Thomas et al., 1996). Moreover, a physical barrier formed by RMS-astrocytes may delineate the migratory pathway and prevent cell dispersion out of the RMS, although this is not yet established (Alves et al., 2002; Jankovski and Sotelo, 1996; Peretto et al., 1997).

Here, we investigate the influence of astrocytes in preventing neuroblast excursion from the RMS and their invasion into areas adjacent to the migratory pathway. For this purpose, we undertook comparative cellular and molecular analyses of astroglial cells isolated from zones permissive to neuroblast migration (OB and RMS), and a nonpermissive region (cortex). We show significant differences in the morphological and molecular phenotypes of astrocytes derived from permissive and nonpermissive areas. These differences plausibly affect the behavior of migratory neuroblasts and thus shed light on the mechanism(s) regulating the specificity of cell migration within the RMS.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C57BL/6 mice aged P1–P3 and P18 ($n = 186$ and 18 , respectively) were used. Animals were either raised at the Cajal Institute or provided by Charles River Labora-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: MICINN; Grant number: BFU2007-60851/BFI; Grant sponsor: OLFACTOSENSE Consortium (CAM); Grant number: P-SEM-0265-2006; Grant sponsor: Castilla-La Mancha Health Research Foundation; Grant number: FISCAM P12007-66.

*Correspondence to: Laura López-Mascaraque, Instituto Cajal (CSIC), Av. Dr. Arce, 37 - 28002, Madrid, Spain. E-mail: mascaraque@icajal.csic.es

Received 18 March 2009; Accepted 22 June 2009

DOI 10.1002/glia.20918

Published online 15 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).